

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ivana Míková

***In vivo a ex vivo* modely povrchových mykóz**

In vivo and *ex vivo* models for superficial mycosis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vít Hubka

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis:

Poděkování

Děkuji mému školiteli Mgr. Vítu Hubkovi za jeho trpělivost, vstřícnost, pomoc s vyhledáváním odborné literatury a za čas obětovaný opravám a kontrolování mé bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Adéle Čmokové, která mě zasvětila do práce v laboratoři. Dík patří i mé rodině a blízkým za velkou podporu během mého studia a zpracovávání této práce.

Abstrakt

V bakalářské práci jsem se zabývala významem využití laboratorních zvířat (*in vivo* modely) a uměle vytvořených tkání (*ex vivo* modely) pro studium povrchových mykóz. Účelem použití těchto modelů je zejména objasnění patogeneze onemocnění (průnik patogena do organismu, klinické, histopatologické a imunologické změny) nebo testování nových metod léčby. Pro úspěšné založení experimentu je stěžejní výběr vhodného a citlivého modelu, metodika přípravy inokula a příprava modelu před inokulací. Mezi nejrozšířenější *in vivo* a *ex vivo* modely patří malí hlodavci (morče, myš, potkan), kožní ekvivalenty a keratinové filmy vyrobené z lidských vlasů, nehtů nebo zvířecích kopyt. Práce shrnuje jejich výhody a nevýhody. Dále se práce zabývá tím, kterými dermatofyty a dimorfními patogeny byly modely úspěšně inokulovány a za jakým konkrétním účelem byly použity. Nejčastěji zkoumaní původci povrchových mykóz patří do skupiny dermatofytů (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*) nebo dimorfních hub (*Blastomyces* a *Sporothrix*). Obě tyto skupiny houbových patogenů způsobují u zvířat a člověka povrchové mykózy, *Blastomyces* a *Sporothrix* mohou být i původci systémových onemocnění. Jejich morfologie a ekologie jsou shrnuty v úvodní kapitole.

Klíčová slova: dermatomykóza, keratin, houbová infekce, povrchové mykózy, blastomykóza, sporotrichóza, zvířecí model, histopatologie, *ex vivo* model

Abstract

In my bachelor thesis I have dealt with the importance of using the laboratory animals (*in vivo* models) and artificial tissue (*ex vivo* models) for studying the superficial mycosis. The purpose of using these models is especially to clarify the pathogenesis of illness (the pathogen's penetration into the organism, the clinical, histopathological and immunological changes) or testing of new treatments. Selection of a suitable and susceptible model, methodics of preparation of the inoculum and preparation of the model before inoculation are crucial for the successful creation of the experiment. Small rodents (guinea-pig, mouse, rat), skin equivalents and keratin films made from human hair, nails and animal hooves are the most used *in vivo* and *ex vivo* models. This bachelor thesis summarizes their advantages and disadvantages. Furthermore, the work deals with the types of dermatophytes and thermally dimorphic fungi used for successful inoculation and with the specific purpose of their use. The dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*) and thermally dimorphic fungi (*Blastomyces* and *Sporothrix*) are the most often researched originators of the superficial mycosis. Both groups cause the animal and human superficial mycosis, *Blastomyces* and *Sporothrix* can cause systemic diseases. Morphology and ecology of pathogens are summarized in the introductory chapter.

Key words: dermatomycosis, keratin, fungal infection, superficial mycosis, blastomycosis, sporotrichosis, animal model, histopathology, *ex vivo* model

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Charakterizace původců povrchových mykóz zkoumaných pomocí <i>in vivo</i> a <i>ex vivo</i> modelů.....	3
2.1	Dermatofyty.....	3
2.2	Dimorfní houby způsobující dermatomykózy.....	7
3	<i>In vivo</i> modely.....	9
3.1	Zvířecí modely.....	10
3.1.1	Morče	10
3.1.2	Myš.....	11
3.1.3	Králík.....	12
3.1.4	Potkan.....	13
3.1.5	Kuře	13
3.1.6	Pes	13
3.1.7	Křeček	14
3.1.8	Člověk	14
3.2	Schéma průběhu inokulace živého laboratorního modelu.....	20
3.2.1	Výběr vhodného modelového zvířete a původce mykóz	20
3.2.2	Chov modelového zvířete.....	21
3.2.3	Příprava inokula	21
3.2.4	Příprava zvířete před inokulací, anestezie.....	22
3.2.5	Podání inokula.....	22
3.3	Hodnocení průběhu infekce.....	23
3.3.1	Klinické hodnocení	23
3.3.2	Histopatologické vyšetření	25
4	<i>Ex vivo</i> modely.....	27
4.1	Metodika výroby <i>ex vivo</i> modelů	27
5	Závěr	31
6	Použitá literatura	33

Seznam použitých zkratek

BHI	Brain Heart Infusion agar s 5 % koňské krve
CNS	centrální nervová soustava
CFU	colony forming units = kolonii tvořící jednotka
DTM	Dermatophyte test medium
GMS	Grocott's methenamine silver stain = typ histologického barvení
HE	hematoxylin-eosin = typ histologického barvení
MEA	malt extract agar = agar se sladinovým extraktem
PAS	periodic acid-Schiff = typ histologického barvení
qRT-PCR	quantitative reverse-transcription real time PCR = kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojené s reverzní transkripcí
RG	risk group = stupeň nebezpečí organismu pro člověka, který přichází s daným organismem do styku v laboratoři
SGA	Sabouraudův glukózový agar
SPF	specific pathogen free = vztahuje se k laboratorním zvířatům, která nejsou s garancí nakažena určitými specifickými patogeny (např. salmonela, tuberkulóza, aj.), mikroflóra modelu není přesně definována

1 Úvod

Práce se zabývá *in vivo* a *ex vivo* modely, které se používají ke studiu kožních mykóz postihujících člověka a zvířata. Experimenty a pozorování se mohou provádět v podmínkách *in vivo* (= lat. „v živém“) tedy přímo na živých organizmech. Ve studiích prováděných *ex vivo* (= lat. „vně živého“) jsou používány tkáně odebrané z živého zvířete či člověka nebo uměle vyrobené tkáně ze zvířecích či lidských buněk.

Původce dermatomykóz lze rozdělit na dermatofyty (rody *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* a *Arthroderma*) a nedermatofytické houby, tj. kvasinky a nedermatofytické vláknité houby (např. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Sporothrix*, aj.) (Nenoff et al. 2014). Ve své bakalářské práci se budu zabývat modely, kde jako patogeny figurovaly vláknité houby. Ty působí celosvětově zhruba 90 % povrchových mykóz. Nejvýznamnější skupinou z pohledu dermatomykologie jsou tzv. dermatofyty, které nejčastěji způsobují povrchové kožní onemocnění zvané tinea. Druhou nejvýznamnější skupinou původců dermatomykóz z hlediska celosvětového významu jsou tzv. dimorfní houby, které mají ve svém životním cyklu jak vláknité, tak kvasinkové stádium. Tyto houby jsou původci tzv. endemických mykóz a vyvolávají kožní, subkutánní a systémové infekce (*Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*). Kožní mykózy jsou způsobovány i mnoha dalšími zástupci vláknitých hub, ale kvůli jejich nízké incidenci nebyly zkoumány na laboratorních modelech a v bakalářské práci jim nevěnuji pozornost.

Onemocnění vyvolaná různými houbovými patogeny činí problémy lidem po celém světě. Infekce keratinizovaných částí těla (kůže, vlasů a nehtů) způsobované dermatofyty postihují až čtvrtinu celosvětové populace a pro člověka tak představují globální problém (Havlickova, Czaika & Friedrich 2008). Největší potíže činí v lidské dospělé populaci onemocnění nehtů, tzv. onychomykóza, která je chronická a často obtížně vyléčitelná. *S. schenckii* má centrum výskytu v tropických a subtropických oblastech, blastomykózy způsobované *B. dermatitidis* postihují především populaci severní a jižní Ameriky. Endemické mykózy bývají často vleklé, obtížně diagnostikovatelné i špatně léčitelné.

Použití vhodného *in vivo* a *ex vivo* modelu nám umožní detailněji poznat průběh houbových infekcí, imunitní odpověď organismu a testovat nové metod léčby. Zvířecí modely se v oblasti studia povrchových mykóz začaly používat na přelomu 19. a 20. století. První záznam o snaze vytvořit zvířecí model pro studium dermatofytů (tinea corporis) pochází z Blochovy publikované studie (1908). Jako model pro studium pulmonární blastomykózy byl poprvé použit pes ve studii Gilchrista a Stokese (1898). Pro studium sporotrichózy se využívaly

jako první zvířecí modely potkani (De Beurman, Gougerot & Vaucher 1908). Van Cutsem a Janssen (1984) studovali na modelu morčete vliv cesty podání inokula na vznik systémové a kožní infekce způsobené dermatofyty *T. mentagrophytes* a *M. canis*. Starší studie hodnotily průběh infekce pouze po klinické stránce (Reinhardt et al. 1974, Greenberg et al. 1976, Kerbs & Allen 1978, Chittasobhon & Smith 1979), později se začalo uplatňovat i hodnocení po stránce histopatologické (Hay et al. 1983, Hay et al. 1988, Sugar & Picard 1988). *Ex vivo* modely se objevují později (21. stol.) (Smijs et al. 2007) jako alternativa ke zvířecím modelům. Tyto modely nacházejí využití převážně v oblasti testování antimykotických přípravků a nových způsobů léčby povrchových mykóz způsobených dermatofyty.

Práce si dává následující cíle:

- shrnout současné poznatky o možnostech využití *in vivo* a *ex vivo* modelů pro studium povrchových mykóz,
- uvést přehled nejčastěji používaných typů *in vivo* a *ex vivo* modelů,
- uvést přehled vláknitých hub, které byly úspěšně zkoumány pomocí modelů,
- podat metodický přehled úspěšné inokulace modelu patogenem,
- shrnout výsledky studií a metodiku hodnocení experimentů.

2 Charakterizace původců povrchových mykóz zkoumaných pomocí *in vivo* a *ex vivo* modelů

V této kapitole jsem přiblížila ekologii, morfologii a metody kultivace hub, které se nejčastěji používají k testování na *in vivo* a *ex vivo* modelech. Použila jsem rozdělení na houby způsobující čistě povrchové mykózy (dermatofyty) a dimorfní houby (původce povrchových i systémových mykóz). Dále jsem zdůvodnila, proč jsou právě tyto druhy tak často zkoumány a charakterizovala jsem onemocnění, která způsobují.

Uvedení původci povrchových mykóz (dermatofyty) včetně některých dimorfních hub (*S. schenckii*) se řadí k tzv. RG-2 organismům, což znamená, že jsou to sice původci onemocnění člověka, ale při práci v laboratoři pro něj neznamenaají vysoký stupeň nebezpečí, neboť jsou k dispozici jednoduchá a účinná preventivní opatření a léčebné prostředky. *B. dermatitidis* lze na základě informací z různých zdrojů zařadit do skupiny RG-2 i RG-3 organismů. RG-3 organismy mohou způsobit vážná až smrtelná onemocnění člověka, mohou však pro ně být k dispozici preventivní nebo léčebné zákroky. Představují vysoké riziko pro jednotlivce, ne však pro větší skupinu jedinců (Ellis et al. 2007, http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html 2013).

2.1 Dermatofyty

Houby řadící se k dermatofytům patří do oddělení *Ascomycota*, řádu *Onygenales* a čeledi *Arthrodermataceae* (Mitchell 2005).

Jedná se o keratofilní houby, které se vyskytují na materiálu s vysokým obsahem keratinu. Dermatofyty jsou schopny keratin rozkládat díky produkci proteolytických enzymů a siřičitanu (redukuje disulfidické můstky v molekulách cystinu, které tvoří z velké části α -keratin). Na základě jejich ekologie se dělí do tří skupin: druhy antropofilní, zoofilní a geofilní. Přírodním hostitelem antropofilních druhů je člověk. Infekce se šíří přímým kontaktem s nakaženým člověkem, nebo infekčními kožními šupinami uvolněnými do prostředí, oblečení a obuvi (Padhye & Summerbell 2005). Zoofilní druhy se vyvinuly z geofilních druhů a některé z nich ztratily schopnost dlouhodobě přežívat v půdním prostředí. Primárně parazitují na zvířatech, jsou ale schopny se šířit i na člověka (Ellis et al. 2007). Typickým zoofilním druhem je *M. canis*, který se přenáší na člověka nejčastěji z koček a psů (Pier et al. 1994). Geofilní druhy se přirozeně vyskytují v půdě, která bývá hlavním zdrojem nákazy pro zvíře i člověka. Přenos těchto druhů ze zvířat na lidi nebo z člověka na člověka

je ojedinělý. V půdě se nachází na keratinovém materiálu (kožní šupiny, vlasy, chlupy, nehty, kopyta, rohy), který pochází z živých i uhynulých zvířat. Nejznámějším geofilním druhem je *M. gypseum* (Weitzman & Summerbell 1995, Padhye & Summerbell 2005).

Onemocnění způsobované dermatofyty se nazývá dermatofytóza neboli tineas (v anglosaské literatuře též ringworm). Dermatofytózy patří ve světě k vůbec nejčastějším onemocněním keratinizovaných částí těla, tedy kůže, vlasů a nehtů (Brillowska-Dabrowska et al. 2007). Jejich původci osidlují oblast epidermis zvanou stratum corneum. Tato vrstva je složena převážně z plochých mrtvých zrohovatělých buněk, obsahuje volné proteiny, lipidy, polysacharidy a aminokyseliny, a díky tomu je její struktura vhodným místem pro růst dermatofytů (Richardson & Edward 2000). Keratinizované části těla jsou bohaté především na protein α -keratin. Ten je složen převážně z molekul cystinu, který obsahuje 2 molekuly aminokyseliny cysteinu propojených disulfidickým můstkem. Těsné spletení čtyř polypeptidových řetězců do α -šroubovice (= protofilamenta) a přítomnost velkého množství S-S můstků je příčinou vysoké odolnosti keratinizovaných částí těla vůči případné degradaci způsobené jinými mikroorganismy. Množství cystinu a organizace protofilament α -keratinu se u různých keratinizovaných částí liší, a tím dává kůži a vlasům/chlupům měkkou a pružnou strukturu a nehtům/drápům/rohům strukturu tuhou a křehkou. Procentuální zastoupení cystinu v kůži a kožních derivátech je různé a má významný vliv na odolnost tkání. Cystin tvoří v kůži ~10 % všech aminokyselin, ve vlasech/chlupech ~14 % a nehtech/drápech/rozích ~20 % (Marchisio 2000).

Dermatofyty se šíří mezi hostiteli prostřednictvím tzv. arthrokonidií. Arthrokonidie mají protáhlý cylindrický (obdélníkový) tvar a jsou produkovány dermatofyty přímo v napadené kůži a nehtech v průběhu infekce. Nachází se také uvnitř napadeného vlasu/chlupu. Arthrokonidie jsou vysoce odolné a vázané v kožních šupinách, vlasech, chlupích nebo nehtech dokáží přetrvávat v prostředí několik let, což vede k opakujícím se a těžko vymýtitelným nákazám (Weitzman & Summerbell 1995, Yazdanparast & Barton 2006). Některá antimykotika (amphotericin B, clotrimazol, griseofulvin) dokonce podporují sporulaci arthrokonidií (Yazdanparast & Barton 2006).

Pro člověka jsou zdrojem infekce způsobené zoofilními dermatofyty domácí mazlíčci nebo méně často zvířata z fauny. Morčata a králíci jsou zdrojem *T. mentagrophytes*, kočky a psi zdrojem *M. canis* (Pier et al. 1994). Obtížně léčitelným a velmi častým onemocněním převážně u lidí vyšších věkových skupin bývají onychomykózy, tedy infekce nehtů lokalizované převážně na dolních končetinách. Predispozice k tomuto onemocnění mají osoby vyššího věku, osoby trpící periferním vaskulárním onemocněním, diabetes mellitus, lupénkou

a dalšími poruchami keratinizace kůže a nehtů (Hay 2001, Nenoff et al. 2014). U zvířecích modelů a velmi vzácně u oslabeného lidského pacienta může z kožních lézí dermatofyt proniknout do krevního oběhu, vnitřních orgánů a způsobit diseminovanou infekci (van Cutsem & Janssen 1984, Venturini et al. 2012).

Podle postižených oblastí na těle člověka lze dermatofytózy rozdělit na *tinea pedis* (praskající léze na chodidlech a meziprstních prostorech nohou), *tinea cruris* (erythematózní, olupující se léze v oblasti třísel a hýždí), *tinea corporis* (léze na neochlupené oblasti horní části trupu a horních i dolních končetinách), *tinea faciei* (léze na obličeji), *tinea barbae* (erythematózní, šupinovitá léze v oblasti vousů), *tinea capitis* (postižení vlasaté části hlavy) a *tinea unguium* neboli onychomykóza (napadení nehtových plotének dermatofyty) (Padhye & Summerbell 2005, Degreef 2008). V případě napadení vlasů nebo chlupů houba proniká do folikulu a odtud prorůstá strukturou vlasu/chlupu ve směru jeho růstu (*endothrix*) nebo obrůstá strukturu vlasu/chlupu zvenčí (*ektothrix*). Kromě zoofilního *M. canis* a *T. mentagrophytes* jsou původci těchto onemocnění nejčastěji antropofilní druhy, např. *T. rubrum*. *Tinea capitis* a *tinea corporis* bývá diagnostikována hlavně u dětí, ostatními onemocněními typu *tinea* pak trpí ve vyšší míře dospělí lidé (Padhye & Summerbell 2005, Skořepová 2008a). Protože *T. mentagrophytes* a *M. canis* jsou běžně izolovanými dermatofyty z klinického materiálu a zároveň snadno infikují zvířecího hostitele, jsou často zkoumanými druhy na laboratorních modelech.

a. Rod *Trichophyton*

U jednotlivých druhů se vyskytují hladkostěnné makro- i mikrokonidie. Makrokonidie se u některých druhů vyskytují jen ojediněle nebo dokonce chybí, vyrůstají jednotlivě po stranách nebo na koncích hyf, mohou být tlusto- a tenkostěnné, nejčastěji protáhlé a kyjovité, s rozměry $8\text{--}50 \times 4\text{--}8 \mu\text{m}$. Mikrokonidie bývají v kultuře častější než makrokonidie, jsou kyjovitého, hruškovitého nebo kulovitého tvaru s rozměry nejčastěji $2\text{--}4 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$, vyrůstají jednotlivě nebo na jednoduchých konidioforech. (Padhye & Summerbell 2005, Ellis et al. 2007).

Častým druhem testovaným na *in vivo* modelech je celosvětově rozšířený *T. mentagrophytes*. Tento název se objevuje převážně ve starších publikacích, podle nejnovější taxonomie je druhu přiřazeno jméno *T. interdigitale* (pohlavní stádium je *A. vanbreuseghemii*). Druh má široké spektrum hostitelů: napadá myši, morčata, klokany, kočky, ovce, koně, králíky aj. U lidí způsobuje vznik lézí na kůži, nejčastěji na skalpu a končetinách. Je známým původcem onemocnění *tinea pedis* (mykózy na kůži a nehtech) a *tinea barbae*. Na vlasech způsobuje

infekci zvanou ektothrix. Takto infikované vlasy však nevykazují fluorescenci pod Woodovou UV lampou (Padhye & Summerbell 2005).

Dalším významnými původci dermatomykóz z rodu *Trichophyton* jsou druhy antropofilní, které nejčastěji způsobují chronické infekce, např. onychomykózy nebo tinea pedis (Hay 2001). Vedle antropofilní formy *T. interdigitale* jsou nejvýznamnějšími antropofilními druhy *T. rubrum* způsobující onemocnění tinea pedis, tinea cruris a tinea unguium a dále *T. tonsurans*, který způsobuje zejména tinea capitis v Severní Americe a Japonsku a tinea corporis v Evropě (Padhye & Summerbell 2005, Ellis et al. 2007). *T. rubrum* je v současnosti pravděpodobně nejběžnějším původcem chronických dermatofytóz ve světě (García-Madrid et al. 2011). V rámci významných druhů rodu *Trichophyton* můžeme ještě jmenovat zoofilní druhy *T. erinacei* a *T. verrucosum* nebo antropofilní *T. concentricum*, který působí infekce především v tropických oblastech (Weitzman & Summerbell 1995).

b. Rod *Microsporum*

Rod *Microsporum* zahrnuje geofilní, zoofilní i antropofilní druhy. Většinou se u druhů tvoří jak mikrokonidie, tak makrokonidie na krátkých konidioforech. Makrokonidie se zavidla vyskytují častěji než mikrokonidie. Tlustostěnné i tenkostěnné makrokonidie bývají vřetenovité, septované, s ornamentovanými stěnami. Mikrokonidie jsou hyalinní, jednobuněčné, hruškovité nebo kyjovité, s hladkým povrchem, vyrůstají obvykle jednotlivě na hyfách. Tvar a velikost spor a povaha buněčné stěny jsou důležitými taxonomickými znaky. Od rodu *Trichophyton* se rod *Microsporum* odlišuje drsnou buněčnou stěnou makrokonidií a jejich vřetenovitým tvarem (Padhye & Summerbell 2005, Pier et al. 1994).

M. canis je celosvětově rozšířený zoofilní druh běžně se vyskytující u koček, psů, koní a primátů. U dětí patří k nejčastějším původcům tinea capitis (ektothrix), dále je původcem tinea corporis a také onychomykózy. K nákaze dojde v případě kontaktu s infikovaným zvířetem, z člověka na člověka se však již infekce nepřenáší (Skořepová 2008a). Pod Woodovou UV lampou vykazují postižené vlasy a kůže světle zelenožlutou fluorescenci (Pier et al. 1994, Padhye & Summerbell 2005, Saunte et al. 2008).

Mezi významné patogeny z rodu *Microsporum* patří i celosvětově rozšířený geofilní druh *M. gypseum*, který tvoří u zvířat a lidí léze zejména na kůži dolních a horních končetin a na skalpu. Houbou napadené vlasy ani kůže nevykazují pod Woodovou UV lampou fluorescenci (Padhye & Summerbell 2005). Dalším významným původcem dermatomykóz je geofilní kosmopolitně se vyskytující druh *M. persicolor*.

c. Rod *Epidermophyton*

E. floccosum patří do skupiny antropofilních druhů, je celosvětově rozšířen. Na začátku 20. století byl na našem území nejčastějším antropofilním dermatofytem, pak ho ale vytlačil *T. rubrum* (Skořepová, 2008b). Obvykle napadá kůži a nehty (tinea pedis, tinea cruris, tinea corporis a onychomykóza). Vlasy a chlupy *in vivo* napadá jen zřídka. V kultuře tvoří pouze makrokonidie, mikrokonidie chybí. Tenkostěnné široce kyjovité makrokonidie s hladkou stěnou vyrůstají z hyf samostatně nebo ve shlucích. Ve starších koloniích dochází ke vzniku chlamydospor. Na SGA tvoří pomalu rostoucí zelenohnědé kolonie s hladkým povrchem, reverz je žlutohnědý (Chittasobhon & Smith 1979, Padhye & Summerbell 2005, Ellis et al. 2007).

d. Rod *Arthroderma*

Rodové jméno *Arthroderma* tradičně označuje pohlavní stadium (= teleomorfa) rodů *Microsporum* a *Trichophyton* (Gräser et al. 1999, Padhye & Summerbell 2005).

Mezi časté patogeny člověka (převážně dětí a mladistvých) a původce tinea corporis, tinea faciae a tinea capitis patří zoofilní druh *A. benhamiae* (Drouot et al. 2009, Hubka et al. 2014). Obvyklými rezervoáry tohoto patogena bývají domácí mazlíčci, konkrétně morčata, králíci a další hlodavci, vzácně psi a kočky (Brasch & Wodarg 2015). *A. benhamiae* vytváří na SGA při 25 °C rychle rostoucí bíložluté, ploché kolonie s mírně zvrásněným povrchem, nepravidelnými okraji a žlutým reverzem. V kultuře vytváří malé množství kulovitých a hroznovitě uspořádaných mikrokonidií. Makrokonidie se většinou netvoří. Zvláštním znakem *A. benhamiae* je tvorba hyfálních spojení mezi sousedními hyfami (Brasch & Wodarg 2015). *A. benhamiae* patří fylogeneticky do rodu *Trichophyton*. Dříve byl druh spojován s nepohlavním stádiem *T. mentagrophytes*. Jak ukázala molekulárně genetická data, *A. benhamiae* i *T. mentagrophytes* reprezentují odlišné druhy. To je důvodem, proč není pro *A. benhamiae* k dispozici jméno pro nepohlavní stádium.

2.2 Dimorfní houby způsobující dermatomykózy

e. Rod *Blastomyces*

Tento rod patří do oddělení *Ascomycota*, řádu *Onygenales* a čeledi *Ajellomycetaceae* (Mitchell 2005).

Blastomyces dermatitidis (= *Chrysosporium dermatitidis* = *Emmonsia dermatitidis*; pohlavní stádium *Ajellomyces dermatitidis*) se řadí mezi tzv. dimorfní houby díky schopnosti

tvořit v kultuře i ve tkáni jak kvasinkové, tak vláknité formy. *B. dermatitidis* tvoří při teplotě 25°C na SGA kolonie nejčastěji bílé, později hnědé barvy se vzdušným vláknitým myceliem. Jednobuněčné hyalinní konidie vyrůstají z konidioforů nebo hyalinního větveného mycelia, jsou vejčité až hruškovité a hladkostěnné, velikosti v průměru 2–10 µm v průměru. Na médiu BHI (Brain Heart Infusion agar s 5 % koňské krve) dochází při teplotě 37 °C k tvorbě kvasinkové formy. Tato forma se běžně vyskytuje v plicní tkáni při histopatologickém vyšetření (di Salvo & Klein 2005, Ellis et al. 2007).

B. dermatitidis způsobuje onemocnění nazývané blastomykóza, které má dvě klinické formy: plicní a kožní. Plicní forma je primární, tzn., že plíce jsou vstupní branou infekce, a tudíž bývají i nejvíce postiženým orgánem. Po vdechnutí myceliálních fragmentů nebo konidií dochází v plicních sklípcích k růstu kvasinkového stádia (Sorensen et al. 1999) a odtud může diseminovat do dalších orgánů (hrtanu, nadledvin, srdce, očí, nosních dutin, urogenitálního systému, CNS atd.). Kožní blastomykóza se projevuje tvorbou verukózních (bradavičnatých) nebo vředovitých lézí. Verukózní kožní léze jsou pokryty vysokou krustou, mají nepravidelný tvar a zřetelné ohraničení. Vředovité léze se objevují nad subkutánním abscesem, ze kterého vytéká hnis (Saccante & Woods 2010). Kožní příznaky jsou nejčastěji sekundární a značí diseminaci plicní formy. Primární kožní blastomykóza vzniká v důsledku poranění kůže s implantací spór patogena. Může sekundárně přejít v systémovou infekci, nejčastěji s postižením plic. První zmínky o pacientovi postiženém blastomykózou pochází již z r. 1894 (Gilchrist 1894, Gilchrist & Stokes 1898).

Přirozeně se houba se vyskytuje v půdě, rozkládající se vegetaci i ptačím trusu, osidluje vlhká místa s minimem světla a kyselým pH. Výskyt blastomykózy je nejčastější v Severní Americe (endemit jižních a jihovýchodních států USA), východní Kanadě a Africe (Saccante & Woods 2010). Nejvíce postiženi bývají psi a lidé. Blastomykóza není přenosná z člověka na člověka nebo ze zvířete na člověka, pouze v případě pokousání nakaženým zvířetem (Sorensen et al. 1999, di Salvo & Klein 2005).

Práce s *B. dermatitidis* představuje nebezpečí pro laboratorní pracovníky, kteří s ním přicházejí do styku. Proto se s touto houbou musí pracovat v podmínkách uzpůsobených pro nebezpečné patogeny typu RG-3 (Ellis et al. 2007).

f. Rod *Sporothrix*

Rod *Sporothrix* patří do oddělení *Ascomycota*, řádu *Ophiostomatales* a čeledi *Ophiostomataceae*. Pohlavní stádium není známo (Mitchell 2005).

Sporothrix schenckii se řadí podobně jako *B. dermatitidis* do skupiny dimorfních hub. Na SGA se při 25 °C tvoří vláknité mycelium s jednoduchými konidiofory a konidiemi. Kolonie jsou pomalu rostoucí, vlhké, se zvrásněným povrchem. Pod mikroskopem jsou viditelné protáhlé konidiofory vyrůstající kolmo z hyfy se shluky jednobuněčných, vejčitých, hyalinních konidií s hladkou stěnou. Velikost konidií se pohybuje v rozmezí $1,4\text{--}2,5 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$. Na médiu BHI dochází při 35–37 °C k tvorbě kvasinkové fáze s buňkami kulovitěho tvaru a velikosti 3–5 μm . Kolonie jsou hladké, vlhké, krémové až hnědé barvy (Ellis et al. 2007).

Tento kosmopolitně se vyskytující druh způsobuje onemocnění sporotrichóza. Nachází se převážně v půdě nebo na odumřelém rostlinném materiálu (seno, dřevo, rašelina) odkud může poraněním proniknout do zvířecího nebo lidského hostitele, ve kterém přetrvá jako pučící kvasinka. Nejčastěji bývají touto houbou infikováni zahradníci, lesníci, zemědělci, zdravotní sestry a děti. Sporotrichóza se vyznačuje tvorbou chronických infekčních vředů v kožní tkáni, zřídka má tendence se šířit lymfatickými cévami do podkoží, zasahuje i klouby a kosti, CNS nebo urogenitální trakt. Drobné hnisající léze se vyskytnou v rozmezí 3–12 týdnů od nákazy. Kromě kožní sporotrichózy se může vyskytnout i varianta plicní a oční. Plicní sporotrichóza vznikne v případě inhalace konidií z přírodního rostlinného substrátu. Velmi běžné je toto onemocnění v tropických a subtropických oblastech (Mexiko, Uruguay, Brazílie, Indie) (Arenas 2005, Ellis et al. 2007, Ghosh, Chakrabarti, & Sharma 1999), v našich zeměpisných šířkách se vyskytuje jen jako importovaná mykóza.

3 *In vivo* modely

Dosud nebyly dokonale objasněny molekulární mechanismy vzniku dermatomykóz, zahrnující např. průnik patogenu do organismu a zdolání obranných mechanismů hostitele, imunitní reakce hostitele na infekci, překonání nemoci aj. Nejen kvůli zřejmým etickým překážkám, které jsou spojené s prováděním experimentů na lidech, slouží zvířecí modely jako vhodný nástroj k pochopení řady těchto procesů (Hay et al. 1983, Venturini et al. 2012). Dalšími oblastmi, ve kterých se modely s úspěchem uplatňují, jsou testování účinnosti nových antimykotických léčiv. Pozornost je věnována zvláště antimykotikům účinným v léčbě onychomykózy, která je často vleklá a neúspěšná. Struktura nehtu poskytuje houbě ideální prostředí pro přežití, léčivo však do hlubších vrstev nehtu proniká obtížně, a tím je znesnadněno vymýcení houbové infekce.

Za účelem vysvětlení těchto nevyřešených otázek je potřeba najít a použít takový zvířecí model, který co nejvěrněji napodobí reálnou patogenezí onemocnění (Shimamura et al. 2012).

3.1 Zvířecí modely

Před zavedením nových metod léčby do praxe se používají k testování těchto metod zvířecí modely. Za účelem zkoumání povrchových mykóz byla vyvinuta a využívána celá řada zvířecích modelů (van Cutsem & Janssen 1984, Saunte et al. 2008). Modelová zvířata musí mít dostatečnou citlivost ke studovaným houbám, aby bylo dosaženo rozvoje infekce (Morozumi et al. 1981). Faktor omezující použitelnost modelu pro některé účely může být tendence k samovolnému odeznění infekce bez léčby, která je popisována např. u králíků a morčat. Přesto většina *in vivo* studií byla prováděna právě na morčatech. V dnešní době se stává stále oblíbenějším modelem pro studium povrchových i systémových mykóz laboratorní myš. (Cambier et al. 2014)

3.1.1 Morče

Morče je často využívaným modelem pro výzkum dermatofytóz, protože infekce vykazuje znaky srovnatelné s infekcí u člověka. Neodráží však úplně přesný průběh onemocnění u lidí (Saunte et al. 2008). Morče je dobře citlivé k infekcím dermatofyty a dochází u něj proto po inokulaci ke spontánnímu vzniku houbové infekce (Treiber et al. 2001). Mimo jiné je snadno chovatelným zvířetem (Shimamura et al. 2012). Morče bylo zvoleno za modelový organizmus v několika studiích, které se zabývaly diagnostikou dermatofytóz, průběhem a charakteristickými znaky onemocnění, příčinou vzniku systémových onemocnění způsobených dermatofyty, vlivem zapaření inokulované kůže na charakteristiku lézí a rychlost jejich založení a testováním účinků nových antimykotických přípravků (Greenberg et al. 1976, Kerbs & Allen 1978, Chittasobhon & Smith 1979, van Cutsem & Janssen 1984, Petranyi 1987, Niwano et al. 1998, Saunte et al. 2008).

Při výzkumech bylo morčatům podáváno inokulum převážně místně na oholenou kůži, mechanicky poškozenou i zdravou. Publikované studie použily řadu druhů dermatofytů, nejčastěji *T. mentagrophytes* (Chittasobhon & Smith 1979, van Cutsem & Janssen 1984, Nagino 2000), *T. rubrum* (Chittasobhon & Smith 1979, van Cutsem & Janssen 1984), *T. tonsurans* (Chittasobhon & Smith 1979), *T. concentricum*, *T. violaceum*, *T. verrucosum* (van Cutsem & Janssen 1984), *M. canis* (Chittasobhon & Smith 1979, Saunte et al. 2008, Aggarwal & Goindi 2012), *M. gypseum* (van Cutsem & Janssen 1984), *M. persicolor* (Chittasobhon & Smith 1979) a *E. floccosum* (Chittasobhon & Smith 1979) (Tabulka 1). Ve studii (van Cutsem & Janssen 1984) bylo inokulum s konidii *T. mentagrophytes* podáno

intravenózně a u modelu došlo ke vzniku systémové mykózy postihující převážně plíce, játra a ledviny.

Používanými plemeny morčat byly např. outbrední (geneticky nedefinované) Chase-Moen (Greenberg et al. 1976), Dunkin Hartley nebo Pirbright White (van Cutsem & Janssen 1984, Petranyi et al. 1987, Nagino et al. 2000, Treiber et al. 2001, Majima et al. 2005, Aggarwal & Goindi 2012).

3.1.2 Myš

Na rozdíl od morčete je myš využívána nejen pro studium dermatofytů, ale i pro zkoumání blastomykóz a sporotrichóz. Myš je v porovnání s morčetem méně náročná na prostor, vykazuje vyšší schopnost reprodukce a jako *in vivo* model umožnila hlubší porozumění patogeneze dermatofytóz včetně rozvoje imunitní reakce v čase (Cambier et al. 2014). Laboratorní myš je v současnosti v oblasti povrchových houbových infekcí nejvíce studovaným zvířetem (Sorensen et al. 1999). Po klinické, histopatologické a imunohistologické stránce vykazuje myši model stejné znaky infekce jako u morčat a u lidí s onemocněním tinea (Cambier et al. 2014). Myši model je také použitelný pro testování vakcín antifungicidních léků a pro stanovení a srovnání virulence různých dermatofytů. Stejně jako v případě modelu morčete došlo i u myši po intravenózním podání inokula s konidii *T. mentagrophates* ke vzniku systémové infekce, kdy se přítomnost houby prokázala v plicích, játrech a ledvinách (van Cutsem & Janssen 1984). Rozšíření infekce způsobené *T. mentagrophytes* do lymfatických uzlin, ledvin, jater a sleziny se děje i u člověka (Venturini et al. 2012).

Z dermatofytů testovaných na myším modelu lze jmenovat *T. mentagrophytes* (van Cutsem & Janssen 1984, Venturini et al. 2012), *T. quinckeanum* (Hay et al. 1983), *Arthroderma benhamiae* a *A. vanbreuseghemii* (Cambier et al. 2014) (Tabulka 1).

Dále byl myši model použit pro studium sporotrichóz, kde byl sledován průběh a charakter onemocnění, vznik imunitní odpovědi na onemocnění nebo rozdílná virulence jednotlivých druhů (Tachibana et al. 1999, Arrillaga-Moncrieff et al. 2009). Z pěti zkoumaných druhů rodu *Sporothrix* byly nejvíce virulentní *S. brasiliensis* a *S. schenckii* a mechanismy tvorby lézí byly druhově specifické. *S. globosa* způsoboval pouze lokální zánět v místě vstupu inokula (Arrillaga-Moncrieff et al. 2009).

Vůbec nejčastěji jsou ale na myši prováděny výzkumy týkající se blastomykóz (Stevens 1997). Model myši dobře napodobuje průběh akutní plicní blastomykózy u lidí (Sugar & Picard 1988). Pro terapeutické studie je nejčastěji používán pro myši vysoce virulentní kmen *B. dermatitidis* ATCC 26199 (Sorensen et al. 1999, Brito et al. 2007). Studie

byly obvykle zaměřeny na sledování průběhu plicní blastomykózy, vlivu způsobu podání inokula na průběh onemocnění, citlivosti jednotlivých plemen myší k *B. dermatitidis* a charakteru imunitní reakce (Morozumi et al. 1981, Kethineni et al. 2006). Ve studii Morozumi, Brummer et al. (1981) bylo zjištěno, že citlivost k houbě je odlišná při použití jiných kmenů myší a jiných způsobů inokulace, tj. u intranazálně podaného inokula vykazoval myší kmen C3H/HeJ vyšší mortalitu (50 %) než kmen DBA/1J (25 %). Při intraperitoneálním podání byla situace opačná (mortalita CH3/HeJ 17 % a DBA/1J 83 %). Při subkutánním podání inokula nebyly rozdíly v citlivosti signifikantní. Kethineni et al. (2006) ve své studii porovnával imunitní reakce mladých a dospělých myší a došel k závěru, že mladé myši byly k infekci náchylnější díky snížené fungicidní aktivitě jejich neutrofilních granulocytů (37%) proti *B. dermatitidis* ve srovnání s granulocyty myší dospělých (80%). Buňky *B. dermatitidis* byly spolu s myšími neutrofilními granulocyty inkubovány při teplotě 37 °C 2 hodiny. Byl odebrán vzorek, inkubován čtyři dny při 35 °C na krevním agaru a poté z něj byla určena hodnota CFU. Fungicidní aktivita byla definována jako snížení hodnoty CFU podle následujícího vzorce: % úmrtnosti buněk *B. dermatitidis* = $(1 - [\text{experimentální hodnota CFU} / \text{původní hodnota CFU v inokulu}]) \times 100$.

Mezi často používaná myší plemena lze zařadit Swiss mouse (Hay et al. 1983, van Cutsem & Janssen 1984), inbrední BALB/c, BALB/K (Hay et al. 1983, Brito et al. 2007) (Tachibana et al. 1999), SPF (= specific pathogen free) Balb/cByJ (Sugar & Picard 1988), Laca (Aggarwal & Goindi 2012), axenický CD-1 (Kethineni et al. 2006), inbrední C3H/HeJ a DBA/1J nebo A/HeJ (Morozumi et al. 1981).

3.1.3 Králík

Králík se jako model osvědčil při studiu kožních a systémových onemocnění způsobených dermatofyty (van Cutsem & Janssen 1984) a při testování antimykotik k léčbě onychomýkóz (Shimamura et al. 2011). Shimamura et al. (2011) testovali na králičím modelu lokální antimykotika (8% ciclopirox, a 5% amorolfín), která jsou schopna dostat se do hlubších vrstev nehtu. Použitým druhem byl nejčastěji *T. mentagrophytes*.

Králík byl také využit i pro studium blastomykóz (Stevens 1997, Sorensen et al. 1999), ne vždy však byl vyhodnocen jako vhodný model (Gilchrist & Stokes 1898).

Van Cutsem a Janssen (1984) použili pro své pokusy králičí plemeno Novozélandský albín.

3.1.4 Potkan

Potkan byl použit pro studium vzniku kožní a systémové infekce způsobené dermatofyty, průběhu onemocnění (van Cutsem & Janssen 1984) a k testování nových postupů léčby dermatomykóz (OPT-NSVs = nonionic surfactant vesicles) (Kumar & Goindi 2014). Kumar a Goindi (2014) léčili tinea pedis u potkanů hydrogelem s obsahem itrakonazolu. Zvolili model potkana kvůli jeho fyziologické podobnosti kůže s kůží lidskou, která je údajně větší, než u modelu myši nebo králíka. Antimykotická aktivita byla hodnocena na základě rozsahu otoku, zarudnutí a vypadávání chlupů v místě inokulace, histopatologického vyšetření a množství houbových buněk v biopsii (histologické obarvení řezů kůže, pod světelným mikroskopem byla srovnána semikvantitativně míra výskytu houbových buněk v léčené a neléčené kůži). V porovnání s běžně používanými fungicidními gely bylo u zvířat ošetřených OPT-NSVs hydrogelem s obsahem itrakonazolu pozorováno rychlé zmírnění infekce díky snazšímu a rychlejšímu pronikání vezikulů do kůže. Z tohoto důvodu může být OPT-NSVs slibnou a účinnou alternativou dosud dostupné antifungální terapie.

Zvířatům byla aplikována inokula obsahující konidie *T. mentagrophytes* a *T. rubrum* (Tabulka 1).

Existují i studie zabývající se testováním sporotrichóz a blastomykóz na potkanech (Stevens 1997, Sorensen et al. 1999, Zhang et al. 2012).

V publikovaných studiích bylo použito plemeno Wistar rat (van Cutsem & Janssen 1984, Kumar & Goindi 2014).

3.1.5 Kuře

Model kuřete je vhodným modelem pro výzkum týkající se dermatofytóz. Pro studium vzniku kožní a systémové infekce způsobené dermatofyty a průběhu onemocnění byl využit model kuřete (kmen Arbor Acre), kterému bylo aplikováno inokulum obsahující konidie *T. mentagrophytes* (van Cutsem & Janssen 1984).

3.1.6 Pes

Pes byl využit pro studium blastomykóz vůbec jako první model (Gilchrist & Stokes 1898). Ve stejné práci Gilchrist a Stokes (1898) platně popsal a pojmenoval patogena *B. dermatitidis*, který v plicích způsoboval vznik nekrotických oblastí a žlutých hrudek velikosti hrášku. Zvířatům bylo intravenózně aplikováno inokulum obsahující neznámého patogena izolované ze člověka (33letý pacient s lézemi na obličeji, hřbetu ruky, tříselech, stehnu a na krku). Gilchrist

a Stokes (1898) použili ve své studii tři psy. Druhému psovi bylo aplikováno intravenózně inokulum vytvořené z postižených a nekrotických oblastí plic prvního psa. Třetímu psu bylo stejným způsobem aplikováno inokulum získané z izolovaných buněk postižených částí plic třetího psa. Byla zjištěna postupná ztráta virulence *B. dermatitidis*. Spolu se psem Gilchrist a Stokes (1898) úspěšně infikoval i koně, ovce a morče. Nejvíce byly houbou postiženy plíce. Na základě srovnání morfologie patogena v postižené plicní tkáni psa a člověka a klinických a histopatologických došli Gilchrist a Stokes (1898) k závěru, že plíce pacienta byly napadeny houbovým patogenem *B. dermatitidis*.

3.1.7 Křeček

Křeček se osvědčil jako model pro studium blastomykóz (Stevens 1997, Sorensen et al. 1999) a sporotrichóz, protože průběh onemocnění u něj věrně napodobuje infekci u člověka (Charoenvit & Taylor 1979).

Použitým plemenem při pokusech byl Syrský outbrední (geneticky nedefinovaný) křeček (Charoenvit & Taylor 1979).

3.1.8 Člověk

Reinhardt et al. (1974) použil lidské dobrovolníky jako nástroj pro výzkum v oblasti lidských dermatofytóz, konkrétně zkoumal patogenezi, imunitní odpověď doprovázející dermatofytózy a testoval antimykotickou léčbu. V laboratorních podmínkách bylo cílem navodit u dobrovolníků infekci, kterou trpěli američtí vojáci ve válce ve Vietnamu. Testovaným druhem byl *T. mentagrophytes* izolovaný ve Vietnamu z amerického vojáka se zánětlivou dermatomykózou. Byly vyloučeny osoby, v jejichž rodině se vyskytoval diabetes. Inokulum bylo aplikováno na intaktní holou kůži kotníku, předloktí a stehna 40 mužů. Na kotníky bylo inokulum aplikováno prostřednictvím vojenských bot se všírou ponožkou napuštěnou inokulem. Po 90 dnech se léze spontánně vyléčily a nedošlo k rozšíření infekce do orgánů v těle s výjimkou jediného dobrovolníka, u kterého došlo ke vzniku rozsáhlého zánětu. Kromě tohoto jedince byli všichni dobrovolníci schopni během experimentu běžně fungovat a nepocíťovali téměř žádnou bolest či nepříjemné pocity v oblasti místa inokulace (Reinhardt et al. 1974).

V další studii byla sledována patofyziologie houbových infekcí a obranné mechanismy pokožky proti povrchovým dermatofytózám a systémovým mykózám. Inokulum bylo aplikováno na předloktí mužského dobrovolníka. Jedna série byla aplikována na holou kůži, druhá na kůži předem ošetřenou steroidní masťou. Inokulum obsahovalo *T. mentagrophytes*.

Pro studování subkutánní infekce bylo použito inokulum se *S. schenckii*. V průběhu čtyř týdnů byly odebírány vzorky z postižené tkáně a infekce byla sledována po stránce klinické, histopatologické a imunologické. Přítomnost steroidní masti potlačila lokální imunitní reakce organismu. Zánětlivá odpověď na houbové patogeny byla výraznější v místě bez aplikace steroidní masti (Nakajima 2005).

Tabulka 1. Tabulka shrnující publikované *in vivo* modely a účel jejich použití.

ZVÍŘECÍ MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	TESTOVANÝ KMEN; PŮVOD	ÚČEL POUŽITÍ MODELU	CITACE
MORČE (<i>Cavia aperea f. porcellus</i>)	<i>T. interdigitale</i> (= <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i>)	ATCC 18748	srovnání průběhu infekce u modelu a člověka	(Greenberg et al. 1976)
	<i>T. mentagrophytes</i>	ATCC 18748	vliv zapaření kůže po místním podání inokula na vzhled léze a na rychlost vyléčení lézí po perorálním podání griseofulvinu	(Kerbs & Allen 1978)
	<i>T. mentagrophytes</i>	TIMM 1189	testování efektivity perorálně podaného flukonazolu a itraconazolu při léčbě dermatofytických lézí	(Nagino et al. 2000)
	<i>T. mentagrophytes</i>	TIMM 2789	testování nového lokálně aplikovaného imidazolového antimykotika NND-502 při léčbě tinea pedis a porovnání účinnosti léku se stávajícími antimykotiky - lanokonazolem a terbinafinem	(Niwan et al. 1998)
	<i>T. mentagrophytes</i>	kůže člověka	testování antimykotika Laudamonium 1% aplikovaného lokálně na kůži ve formě roztoku ve spreji	(Treiber et al. 2001)
	<i>T. mentagrophytes</i>	B32663; pes	zhodnocení patogenity <i>T. mentagrophytes</i> , vzhledu a množství kožních lézí, míry poškození vnitřních orgánů systémovou infekcí a vlivu množství CFU v inokulu aplikovaného intravenózně a lokálně na vznik infekce	(van Cutsem & Janssen 1984)
	<i>T. mentagrophytes</i>	MTCC 7250	testování nového způsobu lokálního podání antimykotika griseofulvinu enkapsulovaného v deformovatelných membránových váčkách (=DMVs);	(Aggarwal & Goindi 2012)
	<i>T. rubrum</i>	MTCC 296	perorální podání bývá spojeno s nežádoucími účinky	
	<i>M. gypseum</i>	MTCC 2830		
	<i>M. canis</i>	MTCC 2820		

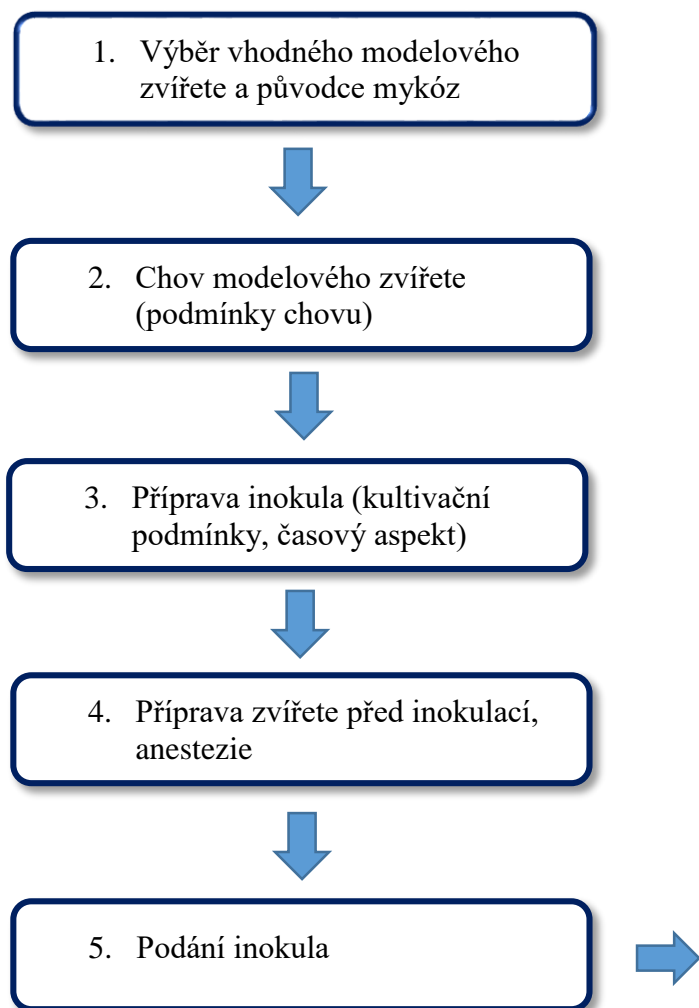
ZVÍŘECÍ MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	TESTOVANÝ KMEN; PŮVOD	ÚČEL POUŽITÍ MODELU	CITACE
MORČE (<i>Cavia aperea f. porcellus</i>)	<i>T. mentagrophytes</i> (= <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>)	potkan	sledování rozdílů v průběhu infekce působené jednotlivými druhy dermatofytů	(Chittasobhon & Smith 1979)
	<i>T. erinacei</i> (= <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>)	ježek		
	<i>T. rubrum</i>	léze na noze člověka		
	<i>T. tonsurans</i>	člověk		
	<i>M. canis</i>	léze skalpu dítěte		
	<i>M. gypseum</i>	potkan		
	<i>M. persicolor</i>	hraboš		
	<i>E. floccosum</i>	léze v třísle člověka		
	<i>T. mentagrophytes</i>	158	testování antimykotické aktivity terbinafinu	
	<i>M. canis</i>	846		
MYŠ (<i>Mus musculus</i>)	<i>T. mentagrophytes</i>	B32663; pes	zhodnocení patogenity <i>T. mentagrophytes</i> , míry postižení vnitřních orgánů systémovou infekcí a vlivu množství CFU v inokulu aplikovaného intravenózně a lokálně na vznik infekce	(van Cutsem & Janssen 1984)
	<i>T. mentagrophytes</i>	2118/99-ILSL	pochopení imunologických a patologických aspektů invazivních dermatofytóz	(Venturini et al. 2012)
	<i>T. mentagrophytes</i> (= <i>T. quinckeanum</i>)	NCPF 309	srovnání citlivosti myších kmenů BALB/c a BALB/K k testovanému druhu houby	(Hay et al. 1983)

ZVÍŘECÍ MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	TESTOVANÝ KMEN; PŮVOD	ÚČEL POUŽITÍ MODELU	CITACE
MYŠ (<i>Mus musculus</i>)	<i>A. benhamiae</i>	IHEM 20163; tinea u lidí, kteří byli v kontaktu s hlodavci	testování nového modelu vhodného pro pochopení imunitních odpovědí organismu na infekci dermatofyty a patogeneze onemocnění u lidí	(Cambier et al. 2014)
	<i>T. interdigitale</i> (= <i>A. vanbreuseghemii</i>)	IHEM 22740; tinea u lidí, kteří byli v kontaktu s hlodavci		
	<i>B. dermatitidis</i>	ATCC 26199	srovnání imunitní odpovědi na plicní blastomykózu u mladých a dospělých myší	(Kethineni et al. 2006)
	<i>B. dermatitidis</i>	ATCC 26199	testování citlivosti modelů k rozvoji plicní blastomykózy v závislosti na cestě podání inokula	(Morozumi et al. 1981)
	<i>B. dermatitidis</i>	ATCC 26199, ATCC 26197	model akutní plicní blastomykózy způsobené konidii <i>B. dermatitidis</i>	(Sugar & Picard 1988)
	<i>S. schenckii</i>	Ss 22932; pacient s lymfokutánní formou sporotrichózy; Ss 22582; pacient s diseminovanou formou sporotrichózy (kůže a kostní tkáň)	srovnání virulence dvou kmenů <i>S. schenckii</i>	(Brito et al. 2007)
	<i>S. schenckii</i>	IFM 5906; kožní sporotrichóza u člověka; IFM 41598; plicní sporotrichóza u člověka	vliv buněčné imunitní odpovědi na infekci	(Tachibana et al. 1999)

ZVÍŘECÍ MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	TESTOVANÝ KMEN; PŮVOD	ÚČEL POUŽITÍ MODELU	CITACE
MYŠ (<i>Mus musculus</i>)	<i>S. albicans</i>	CBS 30273; půda, Velká Británie; KMU 4217; pšenice, Čína	srovnávací studie patogeneze sporotrichózy způsobené různými druhy rodu <i>Sporothrix</i>	(Arrillaga-Moncrieff et al. 2009)
	<i>S. brasiliensis</i>	CBS 1200339; kožní léze u člověka, Brazílie; IPEC 16919; kožní léze u člověka; Brazílie		
	<i>S. globosa</i>	CBS 120340; léze na obličeji, Španělsko; MCCL 220082; neznámý původ, Indie		
	<i>S. mexicana</i>	CBS 120341; půda, Mexiko; CBS 120342; listy karafiátů, Mexiko		
	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-173; biopsie kožní tkáně paže, USA; UTHSC 01-2137; vřed na ruce, USA		
KRÁLÍK (<i>Oryctolagus cuniculus f. domesticus</i>)	<i>T. mentagrophytes</i>	TIMM2789	hodnocení vhodnosti lokálně podávaných antimykotik 8% ciclopiroxu a 5% amorolfinu ve formě laku na nehty pro léčbu onychomykózy	(Shimamura et al. 2011)
	<i>T. mentagrophytes</i>	B32663; pes	zhodnocení patogenity <i>T. mentagrophytes</i> , vzhledu a množství vzniklých lézí a vlivu množství CFU v inokulu aplikovaného intravenózně a lokálně na vznik lézí	(van Cutsem & Janssen 1984)

ZVÍŘECÍ MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	TESTOVANÝ KMEN; PŮVOD	ÚČEL POUŽITÍ MODELU	CITACE
POTKAN (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>T. rubrum</i>	MTCC-3272	testování nového léčebného postup za použití itraconazolu ve formě hydrogelu (OPT-NSVs = optimized nonionic surfactant vesicles), který předchází některým nežádoucím účinkům	(Kumar & Goindi 2014)
	<i>T. mentagrophytes</i>	B32663; pes	zhodnocení patogenity <i>T. mentagrophytes</i> , míry poškození vnitřních orgánů systémovou infekcí a vlivu množství CFU v inokulu aplikovaného intravenózně a lokálně na vznik infekce	(van Cutsem & Janssen 1984)
KŘEČEK (<i>Mesocricetus auratus</i>)	<i>S. schenckii</i>	F33; izolováno z pacienta bez upřesnění lokalizace	patogeneze sporotrichózy u modelu Syrského křečka	(Charoenvit & Taylor 1979)
KUŘE (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	<i>T. mentagrophytes</i>	B32663; pes	zhodnocení patogenity <i>T. mentagrophytes</i> , míry poškození vnitřních orgánů systémovou infekcí a vlivu množství CFU v inokulu aplikovaného intravenózně a lokálně na vznik infekce	(van Cutsem & Janssen 1984)
PES (<i>Canis familiaris</i>)	<i>B. dermatitidis</i>	pacient s lézemi na obličeji, rukou a krku	zjištění postupné ztráty virulence <i>B. dermatitidis</i> podaného intravenózně v inokulu postupně třem psím modelům, srovnání výsledků histopatologie postižené plicní tkáně u psa a člověka	(Gilchrist & Stokes 1898)
ČLOVĚK (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	<i>T. mentagrophytes</i>	?	objasnění patogeneze a obranných mechanismů pokožky proti povrchovým mykózám	(Nakajima 2005)
	<i>S. schenckii</i>	?		
	<i>T. mentagrophytes</i>	americký voják, který působil ve válce ve Vietnamu	úspěšné vytvoření příznivých podmínek pro vznik kožních mykóz, které se ve velké míře vyskytovaly u amerických vojáků ve válce ve Vietnamu; sledování a hodnocení vzniku a vzhledu kožních lézí	(Reinhardt et al. 1974)

3.2 Schéma průběhu inokulace živého laboratorního modelu



Obrázek 1. Schéma naznačující postup před inokulací živého zvířecího modelu.

Převzato a upraveno z <http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA07-GPig/GPig.html> (2016)

3.2.1 Výběr vhodného modelového zvířete a původce mykóz

Při výběru modelu se musí dbát na to, aby zkoumaná houba měla patřičnou afinitu ke tkáni modelu (van Cutsem & Janssen 1984). Pro pokusy (a to neplatí jen u hub způsobujících povrchové mykózy) se nejčastěji používají hlodavci. Jejich výhody spočívají v malé velikosti, kvůli které je chov prostorově nenáročný a mají také nízké nároky na krmení. Dále je výhodná jejich vysoká schopnost reprodukce. Jsou dobře citliví k dermatofytům a mykotická infekce vykazuje klinické a histopatologické znaky podobné infekci u člověka. Většinu těchto podmínek splňuje morče (Shimamura et al. 2012) a myš (Sorensen et al. 1999, Cambier et al. 2014). Dále se testování provádí na potkanech, králících, křečcích, kuřatech a psech. Králík je podle (Shimamura et al. 2011) vhodným modelem pro zkoumání onychomykóz. *In vivo*

modely bývají jak samci, tak samice. Zvířata by neměla být v průběhu chovu napadena žádnými patogeny.

3.2.2 Chov modelového zvířete

Stejně stará zvířata bývají umístěna v klecích po skupinách nebo individuálně v závislosti na jejich velikosti (van Cutsem & Janssen 1984). Jsou chována v přirozených podmínkách (např. morče, teplota 22°C, vzdušná vlhkost 55%) s přísunem vody a potravy (Treiber et al. 2001). Pro srovnání průběhu infekce nebo účinnosti antimykotika s neinfikovaným organismem bývá obvykle vybrána kontrolní skupina modelů.

3.2.3 Příprava inokula

Inokulum se připravuje z kultury houby obvykle získané ze zvířecího i lidského klinického materiálu. Izoláty houby jsou naočkovány na živná média, nejčastěji používanými médii pro kultivaci dermatofytů bývají SGA, agar se sladinným extraktem (Hay et al. 1983) nebo DTM agar (= Dermafophyte test medium) (Reinhardt et al. 1974). U *S. schenckii* a *B. dermatitidis* se používá BHI (Charoenvit & Taylor 1979, Ellis et al. 2007) nebo krevní agar (Morozumi et al. 1981, Sugar & Picard 1988). Výběr média je důležitý pro sporulaci houby, tedy pro tvorbu infekčních houbových spor. Na některých médiích nemusí houby dostatečně sporulovat, což znemožňuje přípravu kvalitního inokula. Například při pokusu Chittasobhon a Smith (1979) muselo být použito pro inkubaci *M. canis* rýžové médium, protože na SGA netvořil daný druh makrokonidie potřebné pro přípravu inokula. Kultury dermatofytů bývají inkubovány řádově několik dnů až týdnů při teplotě okolo 25 °C. *B. dermatitidis* a *S. schenckii* vyžadují teplotu okolo 37 °C, která je nutná pro tvorbu kvasinkového stádia (Morozumi et al. 1981, Saunte et al. 2008). Kolonie v požadované fázi růstu bývají promyty sterilním fyziologickým solným roztokem. Vzácně jsou použity jiné roztoky, například van Cutsem a Janssen (1984) použili k přípravě inokula solný roztok se včelím medem v poměru 9:1. Použití tohoto roztoku vedlo k mírně vyšší infekčnosti v porovnání se zvířaty, kterým bylo inokulum podáno jen v podobě solného roztoku. Inokulum bývá homogenizováno kvůli oddělení spor od hyf (Reinhardt et al. 1974). V inokulu je dále důležité stanovit hodnotu CFU (= colony-forming units), která udává počet životaschopných jednotek v daném objemu inokula (Cambier et al. 2014). Právě koncentrace inokula významně ovlivňuje kromě dalších faktorů úspěšný rozvoj infekce u modelu (Greenberg et al. 1976). Čím větší je objem a hodnota

CFU použitého inokula, tím více zvířat vykazuje znaky mykózy, a tím jsou její projevy závažnější (van Cutsem & Janssen 1984).

3.2.4 Příprava zvířete před inokulací, anestezie

Před aplikací inokula se spóry dermatofytů na kůži je třeba zvířeti nejprve odstranit srst z částí těla vhodných pro inokulaci. Modelu je na určitém místě těla (hřbet, slabiny, tlapky, aj.) oholena srst (obvykle oblast 2×2 až 5×5 cm) a na holou kůži je aplikováno inokulum. Případně může být aplikováno inokulum přímo na holá místa na těle zvířete, např. u kuřat na hřebínek (van Cutsem & Janssen 1984). Kůži lze pro lepší uchycení houbových fragmentů z inokula mechanicky poškodit (abradovat) (van Cutsem & Janssen 1984). Saunte et al. (2008) navrhuje abrazi ostrým předmětem (pemza, brusný papír, zdrsňená skleněná palička). Vysvětlují, že abraze je nevýhodná kvůli následné tvorbě vředů, které vadí při hodnocení infekce. Naproti tomu depilace nebo oholení osrstěných míst poruší kůži pouze povrchově a rovnoměrně. Podle Saunte et al. (2008) je holení holicím strojkem v praxi nejsnazší metoda pro přípravu kůže zvířete.

Během přípravy modelu před inokulací, během inokulace a odběru vzorků tkáně bývá zvíře v anestezii. Anestetikem je nejčastěji diethylether podávaný intraperitoneálně (Morozumi et al. 1981, Sugar & Picard 1988, Sorensen et al. 1999).

3.2.5 Podání inokula

V případě zkoumání projevů dermatofytických kožních infekcí se inokulum podává místně na předem připravenou oblast kůže na těle zvířete. Místní nanesení inokula na kůži vyvolá vznik infekce v kůži, ale ne ve vnitřních orgánech. Pokud je cílem navodit systémovou infekci způsobenou dermatofyty či *B. dermatitidis* nebo *S. schenckii*, inokulace proběhne intranasálně, intraperitoneálně nebo subkutánně. Intravenózně bývá inokulum podáno u myši a potkanů do ocasní žíly, u králíků do žíly na uchu a u kuřat/ kohoutů do žíly na křídle (Morozumi et al. 1981, van Cutsem & Janssen 1984). V případě blastomykóz a sporotrichóz může inokulum obsahovat jak kvasinkové buňky, tak konidie. Pro dosažení vhodnějších podmínek pro růst houby (zapaření kůže) se po místním nanesení inokula oblast překrývá na několik dní vlhkým obvazem nebo náplastí (Reinhardt et al. 1974, Kerbs & Allen 1978).

3.3 Hodnocení průběhu infekce

Po podání inokula je zvíře určitou dobu (dny až týdny) sledováno. Na základě zvolené škály se u něj pozorují a hodnotí klinické projevy infekce či účinnost léčby antimykotiky (van Cutsem & Janssen 1984, Treiber et al. 2001). Modelu je dále provedena biopsie infikované kožní tkáně, drápků či postižených vnitřních orgánů (např. plíce u pulmonární blastomycózy) a vzorky jsou histopatologicky zhodnoceny. Odebrané kožní šupiny z oblasti lézí, kousky drápků či chlupů a vzorky postižených vnitřních orgánů jsou kultivovány na médiu. Růst houby potvrzuje, že organizmus trpí houbovou infekcí (Saunte et al. 2008). Pokud dojde během pokusu k úmrtí modelu, je stanovována mortalita u sledované skupiny (Sugar & Picard 1988).

3.3.1 Klinické hodnocení

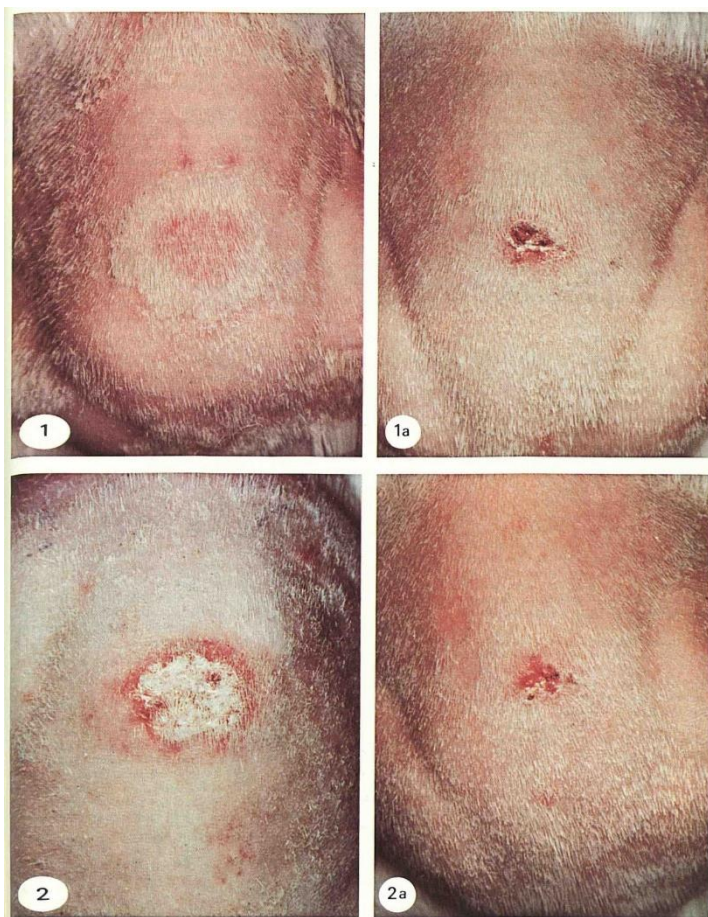
Při klinickém hodnocení průběhu infekce se sleduje vzhled a množství lézí, míra zarudnutí a olupování kůže v postižené oblasti, závažnost zánětlivé odpovědi, délka trvání výskytu lézí nebo reakce infekce na antimykotika (Greenberg et al. 1976, Kerbs & Allen 1978, Treiber et al. 2001). Pozorované změny jsou zaznamenávány a dále hodnoceny. K hodnocení změn byly v několika studiích zabývajících se převážně dermatofyty použity předem stanovené škály či žebříčky s konkrétními parametry charakterizujícími vznikající změny na modelu.

Žebříčky uvedené v publikovaných studiích se od sebe prakticky neliší. Většina má tři až čtyři stupně, kde nejnižší stupeň, 0, vyjadřuje normální stav kůže bez projevů infekce a nejvyšší stupeň (3/4/+++ /++++) charakterizuje známky akutního zánětu. Saunte et al. (2008) si pro hodnocení infekce na kůži morčete způsobené dermatofyty *T. mentagrophytes* a *M. canis* zvolili dva žebříčky. Jeden pro barvu postiženého místa na kůži (0 = normální barva kůže, 1 = růžová, 2 = červená, 3 = fialová) a druhý pro vzhled kožních lézí (0 = zdravá kůže, 1 = vyrážka, 2 = tvorba šupin na kůži a jejich olupování, 3 = tvorba vředů a olupování kůže, 4 = tvorba vředů a olupování vrchních i hlubších vrstev kůže). Treiber et al. (2001) sledovali změny kůže morčete v reakci na její mechanické poškození před aplikací inokula (strup) a infekci způsobenou dermatofytem *T. mentagrophytes* (zarudnutí a olupování kůže). Pro hodnocení změn si stanovili žebříček, kde 0 = žádné změny, + = nepatrné změny, ++ = mírné změny, +++ = závažné změny. Van Cutsem a Janssen (1984) si stanovili následující škálu pro hodnocení patogeneze 27 kmenů dermatofytů u modelu morčete: 0=žádná reakce kůže, bez napadení vlasových folikulů, + = slabá invaze dermatofytů do kůže a chlupů, mírná hyperkeratóza, ++ = zvýšený výskyt dermatofytů v chlupích, vznik krusty (= nakupení degenerovaných zánětlivých buněk na povrch epidermis), mírný zánět a erytém (= zčervenání

kůže), +++ = silný zánět, krusta, erytém, olupování kůže, alopecie (= vypadávání chlupů). Greenberg et al. (1976) ve své studii podle podobné škály hodnotil vzhled lézí u morčat, kterým bylo poprvé v životě aplikováno inokulum s *T. interdigitale* a u morčat, která se s infekcí již dříve setkala. Dále u těchto dvou skupin srovnal rychlost vzniku lézí a léčby mykózy (Obrázek 2). Zjištěné hodnoty jsou dále statisticky vyhodnocovány pomocí Tukey testu, Kruskal-Wallis-H-testu (Nagino et al. 2000, Treiber et al. 2001), Fisherova exaktního testu (Shimamura et al. 2011), testu ANOVA (Cambier et al. 2014) aj.

V případě studia blastomykózy a sporotrichózy se příznaky infekce stanovují pravidelným zkoumáním infikovaného modelu a klinických znaků onemocnění (mírný otok, zarudnutí kůže, změny na srsti) (Charoenvit & Taylor 1979, Sorensen et al. 1999). Rozsah systémové infekce se určuje pomocí kultivace vzorků odebraných z vnitřních orgánů (plíce, játra, slezina, ledviny) usmrceného modelového organismu (Charoenvit & Taylor 1979). Zvířeti je před biopsií podáno anestetikum (Saunte et al. 2008). Po odebrání vzorků bývá zvíře utraceno (Shimamura et al. 2011). U studia systémové blastomykózy je zjišťována míra citlivosti modelu k *B. dermatitidis* a *S. schenckii* závisující na délce doby přežití infikovaného modelu a na počtu zemřelých jedinců ve sledované skupině (Morozumi et al. 1981, Arrillaga-Moncrieff et al. 2009).

Získaná data jsou zpravidla statisticky vyhodnocována pomocí jednoduchých statistických testů, např. Wilcoxonova testu (Sugar & Picard 1988), dvoustranného Mann–Whitney U-testu (Arrillaga-Moncrieff et al. 2009) aj.



Obrázek 2. Infekce způsobená zoofilním druhem *T. interdigitale* u modelu morčete. Deset (1) a patnáct (2) dní stará léze na kůži morčete, kterému bylo poprvé aplikováno inokulum obsahující konidie *T. interdigitale*. U morčete, které již v minulosti přišlo do styku s patogenem, došlo k rychlejšímu vzniku léze (1a – vzhled léze po deseti dnech od počátku infekce) a zároveň i k jejímu rychlejšímu zhojení (2a – vzhled léze po patnácti dnech od počátku infekce).

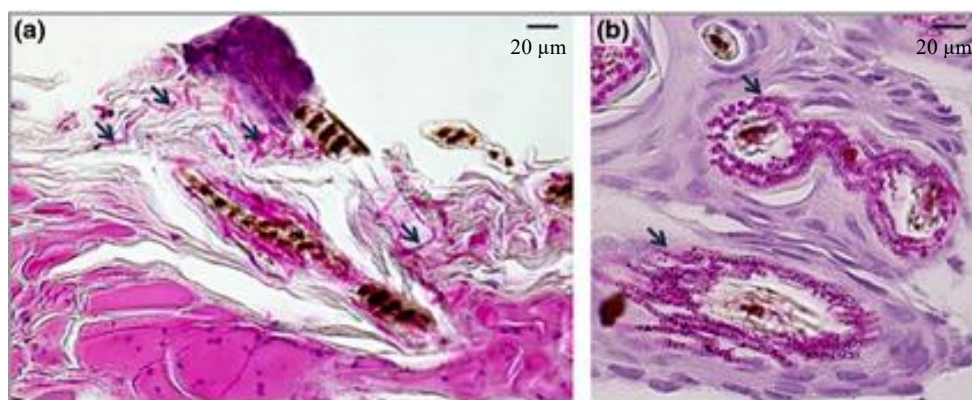
Převzato a upraveno podle Greenberg et al. (1976).

3.3.2 Histopatologické vyšetření

Histopatologické vyšetření kůže, drápků a vnitřních orgánů se provádí kvůli zjištění výskytu houbových hyf ve tkáni a imunologické reakce tkáně na infekci. Z odebraných vzorků fixovaných ve formalínu a zalitých do parafrínu jsou vytvořeny tenké řezy, které jsou pro lepší viditelnost houbových hyf a fragmentů ve světelném mikroskopu obarveny. Nejpoužívanějším histologickým barvivem je PAS (= periodic acid-Schiff). PAS reaguje s polysacharidy obsaženými v houbových buněčných stěnách a barví tyto struktury červenofialově (Obrázek 3). Velmi dobře barví mycelium a arthrokonidie dermatofytů ve svrchních zrohovatělých vrstvách kůže, uvnitř vlasů a chlupů a ve spodních částech nehtů/drápů. Dále se používá barvení HE (= hematoxylin-eozin), které barví houbové buňky modře (Padhye & Summerbell 2005,

Skořepová 2008b, Kumar & Goindi 2014). Kvasinkovité buňky *B. dermatitidis* však neobarví dostatečně výrazně. Vhodnější barvivo pro zviditelnění buněk *B. dermatitidis* i *S. schenckii* je kromě PAS např. GMS (= Grocott's methenamine silver). V některých případech může být použita protilátka označená fluorescenční barvou (např. blankophor nebo calcofluor-white), která specificky obarví houbové struktury ve tkáni (Fumeaux et al. 2004, di Salvo & Klein 2005, Ellis et al. 2007, Drouot et al. 2009, Saccente & Woods 2010).

Díky histopatologii lze také určit typy a množství imunitních buněk a hladinu cytokinů v zánětlivém ložisku a tím pádem charakterizovat imunitní reakci organismu na povrchovou či systémovou mykotickou infekci. Dermatofytické infekce provází zpravidla nález makrofágů, dendritických buněk a neutrofilních granulocytů v blízkosti postiženého místa ve tkáni. Z cytokinů vyskytujících se v postižené tkáni a vyvolávajících imunitní odpověď lze jmenovat TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10 nebo IL-22. Druhy cytokinů a jejich nárůst během infekce se zjišťují z homogenizované buněčné tkáňové kultury (Venturini et al., 2012, Cambier et al. 2014). Data ze studie Venturini et al. (2012) potvrzují, že buněčná imunitní odpověď způsobuje zvýšenou epidermální proliferaci (hyperplázií) usnadňující odstranění dermatofytů z tkáně. V okolí kvasinkových buněk *B. dermatitidis* ve tkáni odebrané z vnitřních orgánů bývají pozorovány neutrofilní granulocyty, lymfocyty a makrofágy (Sugar & Picard 1988). Důležitým prozánětlivým cytokinem zahajujícím imunitní odpověď na blastomykózu a způsobujícím přítok neutrofilních granulocytů do místa zánětu je TNF- α (Kethineni et al. 2006). Kvasinkové buňky *S. schenckii* bývají ve tkáni také obklopeny neutrofilními granulocyty a makrofágy, které jsou aktivovány cytokinem IFN- γ (Arenas 2005, Tachibana et al. 1999).



Obrázek 3. Histologický řez kůže myši (barvení PAS) inokulované *T. interdigitale* (= *A. vanbreuseghemii*). Stratum corneum (a) a vlasové folikuly (b) kolonizované houbovými hyfami a arthrokonidiemi (šipky) sedmý den po vzniku infekce.

Převzato a upraveno podle Cambier et al. (2014).

4 *Ex vivo* modely

Ex vivo modely jsou reprezentovány uměle vytvořenými nebo kultivovanými tkáněmi vyrobenými z lidských vlasů a nehtů, zvířecích kopyt nebo lidských a zvířecích kožních buněk. Tyto modely jsou vyvíjeny zejména za účelem nahrazení *in vivo* modelu při testování účinnosti antimykotik a nových způsobů léčby dermatofytických onemocnění. Cílem je především vytvořit model, který co nejlépe simuluje reálný klinický průběh infekce (Smijs et al. 2007, Lusiana et al. 2013).

Pro výzkum léčby dermatofytů jsou vyvíjeny modely s obsahem keratinu, který je pro ně přirozeným živným substrátem. Pro dimorfní houby (*B. dermatitidis*, *S. schenckii*) způsobující i systémová onemocnění byla v publikovaných studiích sledována převážně imunitní odpověď organismu na základě typů imunitních buněk odebraných z postižených tkání organismu, jejich *in vitro* aktivity vůči buňkám patogena a typů cytokinů produkovaných imunitními buňkami.

4.1 Metodika výroby *ex vivo* modelů

Přirozeným prostředím pro růst dermatofytů je substrát s obsahem keratinu. Ten je pro výrobu *ex vivo* modelů získáván ze struktur bohatých na keratin (kůže, vlasy/chlupy, nehty/kopyta) (Richardson & Edward 2000).

Využití *ex vivo* modelů je shrnuto v *Tabulce 2*.

a. kůže (stratum corneum)

Stratum corneum je svrchní vrstva kůže obsahující mrtvé keratinizované buňky. Tato oblast je díky vysokému obsahu keratinu a omezené aktivitě imunitního systému místem růstu dermatofytů. Pro výrobu *ex vivo* modelu použili Smijs et al. (2007) nepotřebné části kůže pocházející z oddělení plastické chirurgie. Kůže byla zbavena tukové tkáně, promyta destilovanou vodou, upravena na tloušťku 250 μm . Po dalších úpravách (inkubace ve fyziologickém roztoku s obsahem fosfátu a trypsinu při teplotě 4 °C přes noc, 1 hod. při 37 °C ve zmíněném roztoku, vysušení vzduchem při laboratorní teplotě po dobu 24 hod., konzervace plynným dusíkem max. 3 měsíce do doby použití modelu) byl kruhový výřez produktu umístěn na membránový filtr na Petriho misce s médiem MEA. Výsledkem byl *ex vivo* model připravený pro aplikaci inokula a následné testování účinků nových léčebných postupů.

Kožní ekvivalenty mohou být připravovány i uměle. Rashid et al. (1995) použili pro výrobu dermální vrstvy kolagenový gel připravený z buněk šlach ocasu potkana, fibroblasty

z předloktí člověka a fetální telecí sérum. Směs byla dále rozdělena do Petriho misek a inkubována několik dní při teplotě 37 °C. Sérum s obsahem lidských keratinocytů bylo nalito na povrch dermální vrstvy a po sedmidenní inkubaci byla vytvořena několikvrstevná epidermis připravena k aplikaci inokula.

b. vlasy

Lidská a zvířecí keratinové struktury obsahují stejný typ keratinu, a to α -keratin. Lidské vlasy a nehty mají mnoho společných fyzikálních a chemických vlastností. Z důvodu omezené dostupnosti lidských nehtových plotének vytvořili Lusiana et al. (2011) model nehtové ploténky vyrobený z keratinu lidských blond vlasů. Vlasy byly rozemlety na prášek a smíchány s roztokem obsahujícím močovinu. Po zahřátí byl roztok přefiltrován pro odstranění nerozpuštěných vlasů. Po dalším zpracování byl ze směsi vyroben film o tloušťce 100 μ m tenký. Z filmu byly vyrobeny kroužky o průměru 15 mm, vysušeny, umístěny na médium a připraveny k aplikaci inokula a testování účinnosti antimykotik (Obrázek 4).

Vlasy se mimo jiné používají pro tzv. Hair perforation test, kdy lze na základě charakteru narušení struktury vlasu odlišit různé druhy dermatofytů (Padhye & Summerbell 2005).

c. nehty/kopyta

Lidské nehty jsou používány hlavně pro studium léčby onychomýkóz. Odstřížky nehtů jsou získávány od lidských dobrovolníků (Smijs et al. 2014, Yazdanparast & Barton 2006). Jako ekvivalenty k lidským nehtům slouží i kopyta prasat nebo skotu, která jsou změkčena namočením do vody a dále nařezána na tenké pláty o tloušťce stovek mikrometrů (Sambasivarao 2013, Lusiana et al. 2013) (Obrázek 4). Z nehtů bývají vytvořeny řezy silné řádově desítky milimetrů. Nehty i kopyta jsou před zpracováním sterilizovány UV zářením (Monti et al. 2011), dezinfikovány ethanolem, isopropylalkoholem nebo jinými alkoholy, promyty sterilní vodou a dále autoklávovány (15 min při 120 °C) (Sambasivarao 2013). Studie, kterou prováděli Monti et al. (2011), vyhodnotila tenké řezy hovězích kopyt jako vhodné ekvivalenty k lidským nehtům použitelné pro testování antimykotik k léčbě onychomýkózy.

Model nehtu byl také použit k detekci původců onychomýkózy za použití Ramanovy spektroskopie. Je to metoda vibrační molekulové spektroskopie používaná pro identifikaci látek, pro určování jejich složení a struktury. Na zdravé vydezinfikované lidské nehtové odstřížky bylo aplikováno inokulum obsahující mikrokonidie *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* a *T. tonsurans* a suspenze obsahující buňky nedermatofytických hub *Candida albicans*

a *Scopulariopsis brevicaulis*. Modely byly poté inkubovány 2 týdny při teplotě 28 °C ve sterilní vodě v Petriho miskách. Spektra jednotlivých patogenů naměřena za použití spektrometru byla vzájemně porovnána. Patogeny v nehtu byly rozpoznány na základě jejich odlišných spekter. Odlišnost spekter byla dána obsahem různých lipidů v buňkách jednotlivých patogenů (Smijs et al. 2014).

Nehty a kopyta mohou být použity jako modely také ve formě rozemletého prášku. Pro možnost snazšího rozdrčení bývají tyto keratinové struktury zmrazeny v tekutém dusíku. Prášek je na podložním sklíčku rozpuštěn v destilované vodě s obsahem mikrokonidií. Sklíčko je poté umístěno do vlhkého prostředí Petriho misky a dále kultivováno. Studie, kterou prováděli Yazdanparast a Barton (2006), se zabývala vlivem vnějších podmínek na tvorbu arthrokonidií u *T. rubrum*. Sklíčka se suspenzí mikrokonidií *T. rubrum* a nehtovým práškem byla inkubována 14 dní při teplotě 37 °C v aerobním prostředí nebo v atmosféře s obsahem 10 % CO₂. K produkci arthrokonidií došlo pouze v atmosféře s obsahem 10 % CO₂.



Obrázek 4. Stav inokulovaných *ex vivo* modelů po sedmidenní aplikaci lokálního antimykotika. Oba modely byly před zahájením léčby inokulovány dermatofytem *T. rubrum*. Loceryl® Nagellack (účinná látka amorolfín) byl aplikován na keratinový film (vlevo) a způsobil inhibici růstu *T. rubrum* na celé ploše modelu. Lamisil® Creme (účinná látka terbinafin) aplikovaný na tenký řez hovězího kopyta (vpravo) nevykazoval významnou antimykotickou aktivitu.

Převzato a upraveno podle Lusiana et al. (2013).

Příprava roztoku s obsahem houbových infekčních fragmentů (inokula) byla popsána v kapitole „3.2.4 Příprava inokula“. V publikovaných studiích obsahovala inokula aplikovaná na modely nehtů a kopyt konidie *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* a *T. tonsurans* (Smijs et al. 2007, Monti et al. 2011, Smijs et al. 2014). Inokulované modely bývají umístěny do vlhkého prostředí Petriho misek a inkubovány několik dní až týdnů při teplotě 25–28 °C.

Přítomnost houbových struktur v *ex vivo* modelu je nejčastěji stanovována histopatologicky, stejně jako u zvířecích modelů.

Tabulka 2. Účel využití *ex vivo* modelů při studiu povrchových mykóz

MODEL	ZKOUMANÁ HOUBA	ÚČEL POUŽITÍ	VÝSLEDKY	CITACE
KŮŽE (STRATUM CORNEUM)	<i>T. rubrum</i>	testování fotodynamické léčby za použití konkrétních porfyrinových fotosenzitizátorů	čím později po inokulaci modelu je fotodynamická léčba aplikována, tím nižší je její úspěšnost	(Smijs et al. 2007)
	<i>T. mentagrophytes</i>	testování antimykotické aktivity roztoku terbinafinu	po 7 dnech aplikace terbinafinu a inkubaci inokulovaného modelu při 28 °C došlo k vymýcení hyf a arthrokonidií ve vrstvě dermis při koncentraci terbinafinu 0,1 mg · l ⁻¹ a v epidermis při koncentraci terbinafinu 1 mg · l ⁻¹ a větší	(Rashid et al. 1995)
VLASY	<i>T. rubrum</i>	testování antimykotické aktivity různých lokálně aplikovaných léčiv	lepší antimykotická aktivita léku byla ve formě laku a gelu v porovnání s krémem	(Lusiana et al. 2011, Lusiana et al. 2013)
NEHTY/KOPYTA	<i>T. rubrum</i>	srovnání pronikání antimykotika ciklopiroxolaminu do infikovaného lidského nehtu a tenkého řezu kopyta skotu, stanovení vhodnosti tenkých řezů kopyt jako modelů pro studium onychomykóz	řezy kopyt měly stejné vlastnosti jako nehty (schopnost ciklopiroxolaminu proniknout do modelu) tím pádem jsou vhodným modelem	(Monti et al. 2011)
	<i>T. rubrum</i>	sledování optimálních podmínek pro růst arthrokonidií v modelu v závislosti na koncentraci CO ₂	nejvhodnějšími podmínkami pro tvorbu arthrokonidií je teplota 37 °C a atmosféra s 10 % CO ₂ , největší produkce dosáhly arthrokonidie v modelu po 14 dnech	(Yazdanparast & Barton 2006)
	<i>T. rubrum</i>	testování antimykotické aktivity různých lokálně aplikovaných léčiv	lepší antimykotická aktivita léku ve formě laku a gelu v porovnání s krémem	(Lusiana et al. 2013)
	<i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. tonsurans</i>	použití Ramanovy spektroskopie jako nového způsobu detekce původců onychomykóz za použití modelu nehtu	Ramanova spektroskopie byla vyhodnocena jako vhodná neinvazivní metoda diagnostiky onychomykóz včetně přímé identifikace druhů	(Smijs et al. 2014)

d. další tkáně

V případě dimorfních hub (*B. dermatitidis* a *S. schenckii*) bývají často zkoumány imunitní reakce infikovaného organismu a účinky podaných léčiv. Povaha imunitní reakce se stanovuje určením typu imunitních buněk odebraných z infikované tkáně (plíce, slezina, aj.) a typem cytokinů, které jsou imunitními buňkami produkovány (Brummer et al. 1984, Figueiredo et al. 2004, Ferreira et al. 2015).

Patogeneze onemocnění způsobených dimorfními houbami může být sledována za použití umělé tkáně, kterou tyto houby obvykle osidlují. Brandhorst et al. (1999) použili jako *ex vivo* model zdravou myší plicní tkáň, na kterou byly aplikovány kvasinkové buňky *B. dermatitidis* v roztoku. Cílem bylo zjistit, jaká je afinita kvasinkových buněk k buňkám plicní tkáně. Vazba byla určena vizuálně za pomoci mikroskopu po spočítání kvasinkových buněk na jednotku plochy řezu plicní tkání.

Ex vivo modely kůže a kožních ekvivalentů jsou používány především pro studium dermatofytů. Pro studium povrchových mykóz způsobovaných dimorfními houbami nenašly tyto modely prozatím využití.

5 Závěr

Práce shrnuje dostupné informace o možnostech využití *in vivo* a *ex vivo* modelů v oblasti studia povrchových mykóz. Zvířecí modely (*in vivo*) a uměle vyrobené tkáně (*ex vivo*) představují vhodný nástroj pro pochopení patogeneze onemocnění způsobovaných dermatofyty a dimorfními houbami. Poskytují možnost detailního poznání imunitní odpovědi napadeného organismu a testovat vhodné způsoby léčby houbového onemocnění.

Zvířecí modely umožňují sledování klinických znaků a tím pádem poznání průběhu infekce, který je podobný jako u člověka. I přes vyvíjení umělých tkání představují tkáně z živých modelů vhodnější a přirozenější prostředí pro sledování histopatologických změn souvisejících s infekcí.

Vhodnost různých zvířecích modelů se stanovuje podle jejich citlivosti ke zkoumanému patogenu, schopnosti co nejvěrněji napodobit průběh infekce u člověka, velikosti zvířete (usnadňuje manipulaci s modelem) a reprodukční kapacity modelu. Na druhé straně musí model splňovat nároky na patřičnou velikost plochy těla pro lokální aplikaci inokula. Kvůli těmto důvodům bývají nejčastěji používáni jako model malí savci, hlavně hlodavci. Morče má pro studium povrchových mykóz dobré předpoklady díky citlivosti k dermatofytům,

spontánnímu vzniku infekce a klinickým znakům podobným znakům lidským. Myš je nejčastěji používaným zvířetem pro studium blastomykóz díky citlivosti k *B. dermatitidis* a tím pádem snadnému vyvolání blastomykózy. V případě dermatofytóz vykazují myši také klinické znaky podobné lidským znakům.

Vyvinutí *ex vivo* modelů napodobujících co nejvěrněji anatomické struktury přirozených hostitelů zamezuje utrpení živých modelových zvířat s ohledem na jejich diskomfort při provádění pokusů a působenou bolest. S používáním *ex vivo* modelů mizí také etické povinnosti a náklady spojené s chovem živých modelových zvířat.

Snadné šíření houbových patogenů a jejich schopnost dlouhodobě přetrvávat v prostředí a ve tkáních vede k často se opakujícím a vleklým onemocněním, která jsou obtížně vymýtitelná. Z důvodu častých relapsů některých klinických jednotek je nutno zajistit nové a co nejúčinnější způsoby léčby, které dokáží dokonale beze zbytku vymýtit houbový patogen z organismu. První fáze klinického testování léků nelze z etických důvodů provádět na lidech. Léky nejprve musí projít preklinickým testováním, ke kterému bývají nejčastěji využívána pokusná zvířata, uměle vytvořené tkáně nebo tkáně původem z živých organismů.

Molekulární mechanizmy využívané dermatofyty a dimorfními houbami k napadení hostitele a imunitní odpověď hostitele nejsou prozatím do detailu prozkoumány. V budoucnu bude proto vedle testování nových účinnějších způsobů léčby hlavním cílem tyto nevyřešené otázky za pomoci *in vivo* a *ex vivo* modelů objasnit. Bude potřeba pomocí transkripčního a proteomického profilování identifikovat faktory podílející se na patogenezí a charakterizovat enzymy produkované houbou při interakci s epiteliálními buňkami organismu (Achtermann & White 2012). Velký potenciál v oblasti studia povrchových mykóz mají *ex vivo* modely, které se stávají v posledních letech na základě výše uvedených důvodů velmi oblíbenými a v budoucnu by mohly z velké části nahradit laboratorní zvířata. Peres et al. (2016) stanovovali pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (= qRT-PCR) za použití *ex vivo* modelů (lidská kůže, nehty, keratinový film) expresi různých genů *T. rubrum* při interakci s hostitelem. Výsledky ukázaly, že exprese genů je odlišná v interakci *T. rubrum* s různými *ex vivo* modely (lidská kůže, nehty, keratinový film). Tkáně lidského původu (nehty, zbytky nepotřebné kůže z plastické chirurgie) představují materiál s omezenou dostupností. Je tedy snaha nahradit je buď tkáněmi zvířecího původu (kopyta) nebo uměle vytvářenými tkáněmi. Pro co největší strukturální podobnost *ex vivo* a *in vivo* modelů bude výroba *ex vivo* modelů v budoucnu zcela jistě dále zdokonalována.

6 Použitá literatura

- Aggarwal, N. & Goindi, S. (2012). Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*-dermatophytosis. *Int J Pharm*, 437, 277–87.
- Achterman, R. R. & White, T. C. (2012). Dermatophyte virulence factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol*, 2012.
- Arenas, R. (2005). Sporotrichosis. In W. G. Merz & R. J. Hay (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (10th editi, pp. 367–384). London: Hodder, A.
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J. & Mayayo, E. (2009). Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect*, 15, 651–655.
- Bloch, B. (1908). Zur lehre von den dermatomykosen. *Arch Dermatol Res*, 93, 157–220.
- Brandhorst, T. T., Wüthrich, M., Warner, T. & Klein, B. (1999). Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. *J Exp Med*, 189, 1207–16.
- Brasch, J., & Wodarg, S. (2015). Morphological and physiological features of *Arthroderma benhamiae* anamorphs isolated in northern Germany. *Mycoses*, 58, 93–98.
- Brillowska-Dabrowska, A., Saunte, D. M. & Arendrup, M. C. (2007). Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol*, 45, 1200–1204.
- Brito, M. M. S., Conceição-Silva, F. & Morgado, F. N. (2007). Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med Mycol*, 45, 721–9.
- Brummer, E., Sugar, A. M. & Stevens, D. A. (1984). Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and *Blastomyces dermatitidis* in vitro. *J Leukoc Biol*, 36, 505–520.
- Cambier, L., Weatherspoon, A., Defaweux, V., Bagut, E. T., Heinen, M. P., Antoine, N. & Mignon, B. (2014). Assessment of the cutaneous immune response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model. *Br J Dermatol*, 170, 625–33.
- De Beurman, L., Gougerot, H. & Vaucher. (1908). La sporotrichose du rat. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*, 25, 718–732.

- Degreef, H. (2008). Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*, 166, 257–65.
- di Salvo, A. F. & Klein, B. S. (2005). Blastomycosis. In W. G. Merz & R. J. Hay (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (10th ed., pp. 479–501). London: Hodder, A.
- Drouot, S., Mignon, B., Fratti, M., Roosje, P. & Monod, M. (2009). Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Vet Dermatol*, 20, 13–18.
- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R. & Bartley, R. (2007). *Descriptions of medical fungi* (2nd editio). Adelaide.
- Ferreira, L. S., Goncalves, A. C., Portuondo, D. L., Maia, D. C. G., Placeres, M. C. P., Batista-Duharte, A. & Carlos, I. Z. (2015). Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*, 220, 985–992.
- Figueiredo, C. C., De Lima, O. C., De Carvalho, L., Lopes-Bezerra, L. M. & Morandi, V. (2004). The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathogenesis*, 36, 177–188.
- García-Madrid, L., Huizar-López, M., Flores-Romo, L. & Islas-Rodríguez, A. (2011). *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. *Cent Eur J Biol*, 6, 902–910.
- Ghosh, A., Chakrabarti, A. & Sharma, V. K. (1999). Sporotrichosis in Himachal Pradesh (North India). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93, 41–45.
- Gilchrist, T. C. (1894). Protozoan dermatitis. *J Cutan Dis*, 12, 496–9.
- Gilchrist, T. & Stokes, W. (1898). Pseudo-lupus vulgaris caused by a *Blastomyces*. *J Exp Med*, 3, 53–78.
- Gräser, Y., Fari, M. El, Vilgalis, R., Kuijpers, F. A., de Hoog, G. S., Presber, W., & Tietz, H. J. (1999). Phylogeny of the family *Arthrodermataceae* using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Mol Biol Evol*, 37, 105–114.
- Greenberg, J. H., King, R. D., Krebs, S. & Field, R. (1976). A quantitative dermatophyte infection model in the guinea pig--a parallel to the quantitated human infection model. *J Invest Dermatol*.
- Havlickova, B., Czaika, V. & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51, 2–15.

- Hay, R. J. (2001). The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. *Br J Dermatol*, 145, 3–8.
- Hay, R. J., Calderon, R. & Mackenzie, C. D. (1988). Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br J Exp Pathol*, 69, 703–16.
- Hay, R. J., Calderon, R. A. & Collins, M. J. (1983). Experimental dermatophytosis: the clinical and histopathologic features of a mouse model using *Trichophyton quinckeanum* (mouse favus). *J Invest Dermatol*, 81, 270–274.
- Hubka, V., Větrovský, T. & Dobiášová, S. (2014). Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Čes-Slov Derm*, 4, 167–174.
- Charoenvit, Y. & Taylor, R. L. (1979). Experimental sporotrichosis in Syrian hamsters. *Infect Immun*, 23, 366–372.
- Chittasobhon, N. & Smith, J. M. B. (1979). The production of experimental dermatophyte lesions in guinea pigs. *J Invest Dermatol*.
- Kerbs, S. & Allen, A. M. (1978). Effect of occlusion on *Trichophyton mentagrophytes* infections in guinea pigs. *J Invest Dermatol*.
- Kethineni, N., Brummer, E. & Stevens, D. A. (2006). Susceptibility to pulmonary blastomycosis in young compared to adult mice: immune deficiencies in young mice. *Med Mycol*, 44, 51–60.
- Kumar, N. & Goindi, S. (2014). Statistically designed nonionic surfactant vesicles for dermal delivery of itraconazole: Characterization and *in vivo* evaluation using a standardized tinea pedis infection model. *Int J Pharm*, 472, 224–240.
- Lusiana, Reichl, S. & Müller-Goymann, C. C. (2011). Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *Eur J Pharm Biopharm*, 78, 432–440.
- Lusiana, Reichl, S. & Müller-Goymann, C. C. (2013). Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* *in vitro*. *Eur J Pharm Biopharm*, 84, 599–605.
- Majima, T., Masui, S., Uchida, K. & Yamaguchi, H. (2005). A novel mycological analysis valuable for evaluating therapeutic efficacy of antimycotics against experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Mycoses*, 48, 108–13.
- Marchisio, V. F. (2000). Keratinophilic fungi : Their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Biol Dermatophytes Other Keratinophilic Fungi*, 17, 86–92.

- Mitchell, T. G. (2005). Kingdom Fungi: fungal phylogeny and systematic. In W. G. Merz & R. J. Hay (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (10th ed., pp. 43–68). London: Hodder, A.
- Monti, D., Saccomani, L., Chetoni, P., Burgalassi, S., Tampucci, S. & Mailland, F. (2011). Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: *In vitro* ciclopirox transungual permeation. *Br J Dermatol*, 165, 99–105.
- Morozumi, P. A., Brummer, E. & Stevens, D. A. (1981). Strain difference in resistance to infection reversed by route of challenge: Studies in blastomycosis. *Infect Immun*, 34, 623–625.
- Morozumi, P. A., Halpern, J. W. & Stevens, D. A. (1981). Susceptibility differences of inbred strains of mice to blastomycosis. *Infect Immun*, 32, 160–168.
- Nagino, K., Shimohira, H., Ogawa, M., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2000). Comparison of the therapeutic efficacy of oral doses of fluconazole and griseofulvin in a guinea pig model of dermatophytosis. *J Antibiot*, 53, 207–210.
- Nakajima, H. (2005). The pathophysiology and defense mechanism against superficial and subcutaneous fungal infection. *Japan J Med Mycol*, 46, 5–9.
- Nenoff, P., Krüger, C., Ginter-Hanselmayer, G. & Tietz, H.-J. (2014). Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 12, 188–209.
- NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. (2013). Retrieved April 13, 2016, from http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/NIH_Guidelines.html
- Niwano, Y., Kuzuhara, N., Kodama, H., Yoshida, M., Miyazaki, T. & Yamaguchi, H. (1998). *In vitro* and *in vivo* antidermatophyte activities of NND-502, a novel optically active imidazole antimycotic agent. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 967–70.
- Padhye, A. A. & Summerbell, R. C. (2005). The dermatomycosis. In G. M. Merz & R. J. Hay (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (10th ed., pp. 220–243). London: Hodder, A.
- Peres, N. T. de A., Silva, L. G. da & Santos, R. da S. (2016). *In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. *Med Mycol*, 54, 420–427.
- Petranyi, G., Meingassner, J. G. & Mieth, H. (1987). Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 31, 1558–61.

- Pier, A. C., Smith, J. M. B., Alexiou, H., Ellis, D. H., Lund, A. & Pritchard, R. C. (1994). Animal ringworm- its aetiology, public health significance and control. *J Med Vet Mycol*, 32, 133–150.
- Practical animal handling in small mammals-guinea pig. (2016). Retrieved April 14, 2016, from <http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA07-GPig/GPig.html>
- Rashid, A., Edward, M. & Richardson, M. D. (1995). Activity of terbinafine on *Trichophyton mentagrophytes* in a human living skin equivalent model. *J Med Vet Mycol*, 33, 229–233.
- Reinhardt, J. H., Allen, A. M., Gunnison, D. & Akers, W. A. (1974). Experimental human *Trichophyton mentagrophytes* infections. *J Invest Dermatol*, 63, 419–422.
- Richardson, M. & Edward, M. (2000). Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. *Rev Iberoam Micol*, 699, 115–121.
- Saccante, M. & Woods, G. L. (2010). Clinical and laboratory update on blastomycosis. *Clin Microbiol Rev*, 23, 367–381.
- Sambasivarao, S. V. (2013). Ultraviolet C inactivation of dermatophytes: implications for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol*, 18, 1199–1216.
- Saunte, D. M., Hasselby, J. P. & Brillowska-Dabrowska, A. (2008). Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med Mycol*, 46, 303–313.
- Shimamura, T., Kubota, N., Nagasaka, S., Suzuki, T., Mukai, H. & Shibuya, K. (2011). Establishment of a novel model of onychomycosis in rabbits for evaluation of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3150–3155.
- Shimamura, T., Kubota, N. & Shibuya, K. (2012). Animal model of dermatophytosis. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 1–11.
- Skořepová, M. (2008a). Dermatofytózy u dětí. *Pediatric pro Praxi*, 9, 177–180.
- Skořepová, M. (2008b). *Dermatomykologie v obrazech*. (L. Houdek, Ed.) (1st ed.). Praha: Galén.
- Smijs, T. G., Jachtenberg, J. W., Pavel, S., Bakker-Schut, T. C., Willemse-Erix, D., de Haas, E. R. M. & Sterenborg, H. (2014). Detection and differentiation of causative organisms of onychomycosis in an *ex vivo* nail model by means of Raman spectroscopy. *J Eur Acad Dermatology Venereol*, 28, 1492–1499.
- Smijs, T. G. M., Bouwstra, J. A., Schuitmaker, H. J., Talebi, M. & Pavel, S. (2007). A novel *ex vivo* skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. *J Antimicrob Chemother*, 59, 433–440.

- Sorensen, K. N., Clemons, K. V. & Stevens, D. A. (1999). Murine models of blastomycosis, coccidioidomycosis, and histoplasmosis. *Mycopathologia*, 146, 53–65.
- Stevens, D. A. (1997). Animal models of blastomycosis. *Semin Respir Infect*, 12, 196–7.
- Sugar, A.M.Picard, M. (1988). Experimental blastomycosis pneumonia in mice by infection with conidia. *J Med Vet Mycol*, 26, 321–326.
- Tachibana, T., Matsuyama, T. & Mitsuyama, M. (1999). Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol*, 37, 397–404.
- Treiber, A., Pittermann, W. & Schuppe, H. C. (2001). Efficacy testing of antimycotic prophylactics in an animal model. *Int J Hyg Environ Health*, 204, 239–243.
- van Cutsem, J. & Janssen, P. A. J. (1984). Experimental systemic dermatophytosis. *J Invest Dermatol*, 83, 26–31.
- Venturini, J., Alvares, A. M., Camargo, M. R. de, Marchetti, C. M., Fraga-Silva, T. F. de C., Luchini, A. C., & Arruda, M. S. P. de. (2012). Dermatophyte-host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. *Microbes Infect*, 14, 1144–51.
- Weitzman, I. & Summerbell, R. C. (1995). The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*, 8, 240–259.
- Yazdanparast, S. A. & Barton, R. C. (2006). Arthroconidia production in *Trichophyton rubrum* and a new *ex vivo* model of onychomycosis. *J Medi Microbiol*, 55, 1577–81.
- Zhang, X., Zhang, J. & Huang, H. (2012). *Taenia taeniaeformis* in rat favors protracted skin lesions caused by *Sporothrix schenckii* infection: dectin-1 and IL-17 are dispensable for clearance of this fungus. *PLoS One*, 7, 1–8.